

Université de Montréal

**Contrôle de l'expression de la protéine PHEX et rôle de
PHEX et FGF23 dans la minéralisation par les cellules
MC3T3.**

Par

Mathieu St-Louis

Département de biochimie

Faculté de Médecine

Thèse présentée à la Faculté des études supérieures
en vue de l'obtention du grade de PhD
en biochimie

août 2009

© Mathieu St-Louis, 2009

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Cette thèse intitulée :

Contrôle de l'expression de la protéine PHEX et rôle de PHEX et FGF23 dans la
minéralisation par les cellules MC3T3.

Présentée par :
Mathieu St-Louis

a été évaluée par un jury composé des personnes suivantes :

Dr Gérardo Ferbeyre, président-rapporteur
Dr Guy Boileau, directeur de recherche
Dr Stéphane Roy, membre du jury
[Taper le nom] , examinateur externe
[Taper le nom] , représentant du doyen de la FES

Résumé

PHEX est une protéine importante dans le processus de minéralisation osseuse. Des mutations ou la délétion d'une partie de ce gène causent l'hypophosphatémie liée au chromosome X (XLH). Cette maladie est caractérisée par une hypophosphatémie, accompagnée de défauts de minéralisation, de rachitisme et de lésions ostéomalaciques. Avec l'hypophosphatémie, les taux circulants de vitamine D devraient être augmentés, ce qui n'est pas le cas d'où une régulation anormale de la production de vitamine D a lieu. Cependant, malgré le fait que cette protéine soit une peptidase, aucun substrat physiologique n'a encore été répertorié pour PHEX.

PHEX est une protéine membranaire de type II de la famille M13 des métalloendopeptidases à zinc possédant un court domaine N-terminal cytosolique, un segment transmembranaire d'environ 20 acides aminés et une large portion C-terminale extracellulaire où se trouve le site actif de l'enzyme. PHEX est exprimée de façon majoritaire dans les os et dans les dents et elle apparaît à l'initiation de la minéralisation. Les patients souffrant de XLH et la souris *Hyp*, qui est un modèle animal de la maladie humaine, montrent des quantités importantes de la protéine FGF23. De plus, FGF23 est impliqué dans une autre maladie reliée au métabolisme du phosphate, l'hypophosphatémie rachitique autosomale dominante (ADHR) où des mutations de FGF23 causent sensiblement les mêmes symptômes que XLH. FGF23 est produit principalement par les ostéoblastes et les ostéocytes. FGF23 cause une hypophosphatémie par la diminution de l'expression du cotransporteur NaPi de type II, responsable de la réabsorption du phosphate rénal. L'hypothèse proposée dans la littérature serait que PHEX activerait ou inactiverait des peptides importants pour la minéralisation osseuse. Plus spécifiquement, l'activation ou l'inactivation de ces peptides aurait pour rôle de réguler les quantités de FGF23.

Selon l'hypothèse mentionnée précédemment, la régulation de PHEX pourrait donc avoir un effet sur la minéralisation. Une quantité croissante de données sur la régulation de

PHEX sont maintenant disponibles. Par exemple, la vitamine D diminue l'expression de PHEX tandis que les glucocorticoïdes et l'hormone de croissance augmentent son expression. Dans une première étude, nous avons voulu déterminer si un peptide relié à la minéralisation osseuse, le PTHrP₁₋₃₄, pouvait réguler l'expression de PHEX. Nous avons déterminé que le PTHrP₁₋₃₄ peut réguler de façon négative l'expression de PHEX dans les cellules UMR-106, une lignée cellulaire ostéoblastique. Cette régulation passe par la voie de l'AMPc/protéine kinase A. De plus, cette diminution d'expression est également observée au jour 7 dans des cultures primaires d'ostéoblastes de rat en minéralisation.

Par la suite, nous avons étudié un mutant de PHEX, le mutant E4Q retrouvé chez un patient souffrant de XLH, où la mutation se retrouve dans le domaine cytosolique de PHEX. Cette mutation n'interfère pas avec le site catalytique de l'enzyme puisque ce mutant de PHEX peut tout aussi bien cliver un substrat synthétique que la protéine sauvage. Il a été déterminé que cette mutation annule un motif di-acide. Nous avons démontré que ce motif di-acide est responsable de la liaison de PHEX à COPII, responsable de la formation de vésicules de sécrétion. De plus, il semblerait que ce motif soit important, probablement par son interaction avec COPII, à l'incorporation de PHEX dans des vésicules de calcification, lesdites vésicules étant importantes dans le processus de minéralisation. Finalement, des essais de compétitions ont démontré que la minéralisation pouvait être perturbée lorsque l'on surexprimait la queue cytosolique sauvage de PHEX, contrairement à la queue mutée. Ceci suggère possiblement que l'interaction avec COPII menant à l'incorporation de PHEX dans les vésicules de calcification ou d'autres protéines comprenant de tels motifs pourrait être importante pour la minéralisation.

Finalement, la dernière étude porte sur la protéine FGF23. Nous avons démontré, par la surexpression de FGF23 dans la lignée MC3T3 d'ostéoblastes de souris, que cette surexpression a un effet sur la sénescence de ces cellules. En effet, des essais de sénescence ont montré l'augmentation de celle-ci lorsque FGF23 est surexprimé. Par contre, la prolifération n'est pas altérée. De plus, il semblerait que la différenciation soit plus rapide,

tel qu'observé par une minéralisation survenant plus tôt, mais n'étant pas plus importante. Bref, la surexpression de FGF23 semblerait faire en sorte que les ostéoblastes se différencient plus rapidement et passent donc à un état de sénescence prématuré comparativement aux cellules sauvages. Ceci est en accord avec la littérature où KLOTHO, un cofacteur de FGF23 permettant sa liaison avec une plus grande affinité sur son récepteur, lorsqu'inactivé démontre un phénotype similaire au vieillissement incluant un phénotype de sénescence.

Mots-clés : PHEX, FGF23, minéralisation, ostéoblastes

Abstract

PHEX is an important protein in the process of osseous mineralisation. Mutations or deletions of a part of the *PHEX* gene cause X-linked hypophosphatemia (XLH). This disease is characterized by hypophosphatemia, accompanied by defects of bone mineralisation, rickets and osteomalacia. With the hypophosphatemia, the circulating levels of vitamin D should be increased, which is not the case where an abnormal regulation of the production of vitamin D takes place. However, in spite of the fact that this protein is a peptidase, no physiological substrate has been identified.

PHEX is a membrane type II integral protein member of the M13 family of zinc metalloendopeptidasee. These proteins have a short N-terminal cytosolic domain, a transmembrane domain of approximately 20 amino acids and a large extracellular C-terminal portion where the active site of the enzyme is located. PHEX is expressed predominantly in bones and teeth in osteoblasts and odontoblasts, respectively. PHEX is expressed at initiation of mineralization. Patients suffering from XLH and the *Hyp* mouse, which has been used widely as an animal model of the human disease, show large quantities of the FGF23 protein. Moreover, FGF23 is implicated in another disease connected to phosphate metabolism, the autosomal dominant hypophosphatemic rickets (ADHR) where activating mutations in FGF23 cause roughly the same symptoms as XLH. FGF23 is produced mainly by osteoblasts and osteocytes. FGF23 causes hypophosphatemia by decreasing the expression of the type II sodium phosphate cotransporter, partly responsible for renal phosphate reabsorption. The hypothesis suggested in the literature would be that PHEX would activate or inactivate important peptides for osseous mineralisation. More specifically, the activation or the inactivation of these peptides would have a role in the control of FGF23 expression.

According to the assumption mentioned previously, the regulation of PHEX could thus have an effect on mineralization. An increasing quantity of data on the regulation of

PHEX is now available. For example, vitamin D decreases the expression of PHEX while glucocorticoids and growth hormone increase its expression. In a first study, we examined the possibility that a peptide connected to osseous mineralization could control the expression of PHEX. We determined that PTHrP₁₋₃₄ can control in a negative way the expression of PHEX in UMR-106 cells, a cell line of osteoblastic origin. This regulation involves the cAMP/protein kinase A pathway. Moreover, this decrease in PHEX expression is also observed at day 7 in primary cultures of mineralizing rat osteoblasts.

Next, we looked more closely at PHEX cellular localization. We used a mutant of PHEX, mutant E4Q identified in an XLH patient, where the mutated amino acid is found in the cytosolic domain of PHEX. This change does not interfere with the catalytic site of the enzyme since this PHEX mutant can still cleave a synthetic substrate as well as wildtype protein. This mutation disrupts a di-acidic motif present in the cytosolic domain of PHEX. We showed that this di-acidic motif is responsible for the interaction of PHEX with COPII, a protein complex involved in the formation of secretion vesicles. Moreover, it would seem that this di-acidic motif is important, probably by its interaction with COPII, to the incorporation of PHEX in matrix vesicles, which are important in the mineralization process. Finally, competition assays showed that mineralization could be disturbed when the wildtype PHEX cytosolic tail is overexpressed, as opposed with the mutated cytosolic tail. This suggests that the interaction with COPII and the subsequent incorporation of PHEX in matrix vesicles or other proteins that possesses this motif could be important for mineralization.

Finally, the last study examined the role of FGF23 on mineralization. We showed, by the overexpression of FGF23 in the mouse MC3T3 osteoblast cell line, that FGF23 can cause senescence of these cells. On the other hand, proliferation is not affected. Moreover, differentiation seems to occur at a faster rate, as indicated by earlier mineralization. Overexpression of FGF23 would accelerate differentiation and induce senescence. This is in agreement with the literature where KLOTHO, a FGF23 cofactor that increase the

affinity of FGF23 for its receptor, when inactivated, shows a similar phenotype that includes senescence and aging.

Keywords : PHEX, FGF23, mineralization, osteoblasts

Table des matières

Chapitre 1 – Introduction	1
I) Revue de la littérature.....	2
1) Le tissu osseux	2
1.1) Organisation du tissu osseux	3
1.2) L'ossification	4
1.2.1) L'ostéogenèse	4
1.2.2) Ossification intramembraneuse.....	5
1.2.3) La croissance des os par apposition.....	6
1.2.4) Ossification endochondrale.....	6
1.2.4.1 Événements moléculaires de l'ossification endochondrale.....	7
1.3) Les composantes cellulaires du tissu osseux	10
1.3.1) Les cellules de la lignée ostéoblastique	10
1.3.1.2) Les ostéoblastes	12
1.3.1.3) Les ostéocytes	14
1.3.1.3.1) Fonction des ostéocytes	15
1.3.1.3.2) La méchanotransduction	16
1.3.1.4) Embryologie de la lignée ostéoblastique	17
1.3.1.5.1) La famille Runx	19
1.3.1.5.2) Ostérinx.....	21
1.3.1.5.3) WNTs.....	21
1.3.1.5.4) Autres facteurs importants	22
1.3.2) Les cellules de la lignée ostéoclastique	23
1.3.2.1) Fonction des ostéoclastes.....	24
1.3.2.2) Embryologie des ostéoclastes	25
1.3.2.2.1) Différenciation des monocytes en précurseurs des ostéoclastes..	25
1.3.2.2.2) Différenciation des précurseurs des ostéoclastes en osétoclastes matures	28

1.4) La matrice extracellulaire	31
1.4.1) Le collagène	31
1.4.2) Les protéoglycans	31
1.4.3) Les glycoprotéines	33
1.4.3.1) La phosphatase alcaline	34
1.4.3.2) Les autres glycoprotéines de la matrice extracellulaire	34
1.4.4) Les « sibilings » et les molécules d'adhésion à motif RGD	35
1.4.5) Les protéines γ -carboxylées	38
1.4.5.1) L'ostéocalcine	39
1.4.5.1) L'ostéocalcine et le métabolisme énergétique	39
1.4.5.2) Les autres protéines γ -carboxylées	41
1.5) La minéralisation	43
1.5.1) Dépôt des cristaux d'hydroxyapatite	43
1.5.1.1) Les vésicules de calcification	44
1.5.1.1.1) ENPP1	46
1.5.1.1.2) Phosphatase alcaline	46
1.5.1.1.3) ANK	47
1.5.2) Modèle de la minéralisation par les vésicules de calcification	48
2) Le métabolisme du phosphate et les désordres cliniques liés au phosphate	50
2.1) Le métabolisme du phosphate	50
2.1.1) L'absorption intestinale de phosphate	51
2.1.2) La réabsorption rénale du phosphate	51
2.1.2.1) Mécanismes moléculaires du transport du phosphate	52
2.1.2.1.1) Le cotransporteur NaPi de type I	53
2.1.2.1.2) Le cotransporteur NaPi de type II	53
2.1.2.1.3) Le cotransporteur NaPi de type III	55
2.2) La vitamine D et le PTH comme réseau du métabolisme du phosphate	56
2.2.1) Actions de la vitamine D	56

2.2.2) Rôle de la vitamine D sur d'autres types cellulaires.....	58
2.2) Les désordres cliniques reliés au transport du phosphate	58
2.2.1) L'hypophosphatémie liée au chromosome X (XLH)	59
2.2.1.1) Aspects cliniques et biochimiques de XLH.....	60
2.2.1.2) La mutation du gène <i>PHEX</i> , la cause de XLH	61
2.2.1.2.1) Biochimie de <i>PHEX</i>	63
2.2.1.2.3) Localisation et régulation de <i>PHEX</i>	65
2.2.1.2.2) Rôle physiologique potentiel de <i>PHEX</i>	67
2.2.1.4) Le métabolisme du phosphate chez les souris <i>Hyp</i> et XLH	68
2.2.1.5) Le métabolisme de la vitamine D chez les souris <i>Hyp</i> et XLH	71
2.2.1.6) Le tissu osseux chez les souris <i>Hyp</i> et XLH.....	73
2.2.2) le rachitisme hypophosphatémique héréditaire autosomique avec hypercalciurie (HHRH).....	75
2.2.3) L'hypophosphatémie rachitique autosomale dominante (ADRH)	76
2.2.3.1) Aspects cliniques et biochimiques de ADRH.....	77
2.2.3.2) FGF23, la cause de ADHR	77
2.2.3.2.1) Biochimie de FGF23.....	78
2.2.3.3) Le métabolisme du phosphate chez les patients ADHR.....	82
2.2.3.4) Le métabolisme de la vitamine D chez les patients ADHR.....	85
2.2.4 L'ostéomalacie hypophosphatémique oncogénique	86
2.2.4.1) sFRP4 comme protéine causant de l'hypophosphatémie	87
2.2.4.2) MEPE comme protéine causant de l'hypophosphatémie	88
2.2.4.2.1) MEPE dans le métabolisme du phosphate.....	88
2.2.4.2.2) MEPE dans le métabolisme de la vitamine D.....	89
2.2.4.2.3) MEPE au niveau des cellules osseuses	89
3) Le transport des protéines vers la membrane plasmique	91
3.1) La membrane plasmique.....	91
3.2) Les protéines membranaires	92

3.3) Modifications des protéines dans la voie d'exocytose.....	93
3.3.1) Glycosylation des protéines membranaires	93
3.3.2) Formation des ponts disulfure.....	94
3.3.3) Repliement des protéines et dégradation	95
3.4) Les signaux de localisation cellulaire des protéines membranaires	95
3.4.1) Signaux de rétention au RE	98
3.4.2) Signaux d'export du RE.....	102
3.4.2.1) Les vésicules COPII.....	104
3.4.2.2) Les vésicules COPI.....	104
3.4.3) Transport à la membrane plasmique	105
3.4.3.1) Transport à la membrane apicale	106
3.4.3.2) Transport à la membrane basolatérale.....	106
II) Objectifs de recherche.....	107
Chapitre 2 – Article: Parathyroid Hormone-Related Protein(1-34) Regulates Phex Expression in Osteoblasts Through the Protein Kinase A Pathway.	109
Mise en contexte	109
ABSTRACT	112
INTRODUCTION	113
MATERIALS AND METHODS.....	116
<i>Reagents</i>	116
<i>Culture of UMR-106 cells and treatments</i>	116
<i>Culture of fetal rat calvaria cells and treatments</i>	117
<i>RNA extraction</i>	118
<i>Phex and NEP mRNA semi-quantification by RT-PCR</i>	118
<i>Phex protein extraction and immunoblotting</i>	119
<i>cAMP accumulation assays.</i>	120
<i>PKC activation</i>	120
<i>Statistical Analyses</i>	121

RESULTS	123
<i>PTHrP(1-34) down-regulates Phex expression in UMR-106 cells</i>	123
<i>PKC up-regulates Phex expression in UMR-106 cells</i>	124
<i>The cAMP pathway down-regulates Phex expression in UMR-106 cells</i>	125
<i>Interaction between PKC and PKA in the regulation of Phex mRNA levels in UMR-106 cells</i>	125
<i>PTHrP(1-34) does not regulate Phex mRNA levels through PKC activation in UMR-106 cells</i>	126
<i>PTHrP(1-34) down-regulates Phex mRNA levels through PKA in UMR-106 cells</i> ..	127
<i>PTHrP(1-34) and forskolin but not TPA affect Phex mRNA levels in cultures of rat calvaria cells</i>	128
DISCUSSION	129
ACKNOWLEDGMENTS	133
REFERENCES	134
Chapitre 3 – Article: PHEX cytosolic di-acidic motif is important for its incorporation in bone matrix vesicles	153
Mise en contexte	153
ABSTRACT	155
INTRODUCTION	156
MATERIAL AND METHODS	162
<i>Reagents and antibodies</i>	162
<i>Cells and cell culture</i>	162
<i>DNA constructs and mutagenesis</i>	163
<i>Cell transfection and retroviral infection</i>	163
<i>SDS-PAGE, immunoblotting, endoglycosidase digestion and pulse-chase studies</i> ...	164
<i>Wild-type-PHEX and E4Q-PHEX activity using Abz-GFSDYK(Dnp)-OH as substrate</i>	164
<i>Biotinylation of cell surface proteins</i>	165

<i>Purification of PHEX cytosolic domains and in vitro interaction with the COPII coat proteins</i>	166
<i>MV isolation and alizarin red staining</i>	167
<i>Quantitative RT-PCR</i>	168
RESULTS	170
<i>Interaction of PHEX cytosolic domain with the COPII coat proteins.</i>	170
<i>Biosynthesis of the E4Q-PHEX mutant protein.</i>	171
<i>Activity of E4Q-PHEX</i>	173
<i>Incorporation of chimeric PHEX/NEP proteins into MVs</i>	176
<i>Expression of wild-type PHEX cytosolic tail decreases mineralization in MC3T3 cells.</i>	177
DISCUSSION	179
REFERENCES.....	184
Chapitre 4 – Article: Overexpression of FGF23 impairs mineralization in MC3T3 cells via a senescence pathway.....	198
Mise en contexte	198
Abstract	201
INTRODUCTION	203
MATERIAL AND METHODS	206
<i>Reagents and antibodies</i>	206
<i>Cells and cell culture</i>	206
<i>DNA constructs</i>	206
<i>Retroviral infection</i>	207
<i>Cell proliferation assays</i>	208
<i>Mineralization assays and alizarin red staining</i>	209
<i>Senescence- associated β-Galactosidase (SA-β-gal) staining</i>	209
<i>Alkaline phosphatase activity</i>	210
<i>Quantitative RT-PCR</i>	210

RESULTS AND DISCUSSION	212
<i>Expression of FGF23 and FGF23/FLAG in MC3T3 cells.</i>	212
<i>Overexpression of FGF23 does not affect proliferation.</i>	213
<i>Expression of marker genes in MC3T3 cells overexpressing FGF23.</i>	213
<i>MC3T3 cells expressing FGF23/FLAG display early mineralization.</i>	214
<i>FGF23 overexpression induces senescence in MC3T3 cells.</i>	215
REFERENCES.....	220
Chapitre 5 – discussion et conclusions	231
I) Discussion	231
1) La régulation de PHEX.....	232
1.1) La régulation de PHEX par la voie de la protéine kinase A.	232
1.2) La régulation de PHEX par la voie de la protéine kinase C.	235
2) La localisation cellulaire de PHEX.....	236
2.1) Localisation sous-cellulaire de PHEX et le processus de minéralisation	236
3) FGF23 dans la minéralisation.	240
4) FGF23 dans le métabolisme du phosphate	243
5) La différenciation des ostéoblastes	244
II) Conclusion	249
Bibliographie.....	252
Annexe I : Autres contributions de l’auteur à d’autres articles qui ne sont pas inclus dans cette thèse.....	301
Annexe II : Accord des coauteurs (article 1)	302
Annexe III : Accord des coauteurs (article 2)	303
Annexe IV : Accord des coauteurs (article 3).....	304

Liste des tableaux

Introduction

Tableau I : Les principaux protéoglycans de la matrice extracellulaire osseuse	32
Tableau II : Les SIBLINGS et leurs fonctions.....	36
Tableau III : Les autres protéines à motif RGD de la matrice extracellulaire osseuse	38
Tableau IV : Signaux et motifs de localisation cellulaire	96

Résultats

Article 1- Parathyroid Hormone-Related Protein(1-34) Regulates Phex Expression in Osteoblasts Through the Protein Kinase A Pathway.

Table I : Effects of PTHrP (1-34), PTHrP(107-111), PTH(1-34) and PTH fragments on Phex mRNA levels in UMR-106 cells.	142
Table II : Effects of protein kinase C pathway on Phex mRNA levels in UMR-106 cells.	143
Table III : Effects of cAMP pathway on Phex mRNA levels in UMR-106 cells.	144

Article3- Article: Overexpression of FGF23 impairs mineralization in MC3T3 cells via a senescence pathway.

Table I : Primers involved in this study	219
--	-----

Liste des figures

Introduction

Figure 1 : Différenciation des lignées ostéoblastiques et ostéoclastique (Kobayashi and Kronenberg 2005)	11
Figure 2 : La signalisation lors de la chondrogénèse et de l'ostéogénèse (Lian, Stein et al. 2006).	18
Figure 3 : Composantes des ostéoclastes (Teitelbaum and Ross 2003).....	26
Figure 4 : Différenciation des ostéoclastes (Teitelbaum and Ross 2003).....	27
Figure 5 : Voie de signalisation RANK/RANKL (Teitelbaum and Ross 2003).....	30
Figure 6 : Modèle de la minéralisation osseuse impliquant les vésicules d'hydroxyapatite (Harmey, Hessle et al. 2004).....	49
Figure 7: Fréquence des différents types de mutations présentes dans le gène de PHEX (www.phexdb.mcgill.ca).....	62
Figure 8: Fréquence des changements dans chaque exon (www.phexdb.mcgill.ca).....	62
Figure 9: Membres de la famille de l'endopeptidase neutre	64
Figure 10: Fonctionnement potentiel de PHEX au niveau des os et des reins (modifié de Yu and White 2005).....	73
Figure 11 : Export des protéines vers les différents compartiments cellulaires (www.ergito.com).	101

Liste des sigles et des abréviations

ADN :	Acide désoxyribonucléique
ADNc :	AND complémentaire
ADRH :	Hypophosphatémie rachitique autosomale dominante
Aes :	Amino-terminal enhancer of Split
ARF1 :	ADP-ribosylation factor 1
AMPc :	Adénosine monophosphate cyclique
AP-1 :	Activator protein 1
AP-4 :	Activator protein 4
ARHR :	autosomal recessive hypophosphatemic rickets
ARN :	Acide ribonucléique
ARNm :	ARN messenger
ASARM :	acidic-serine-aspartate-rich associated motif
ATF4 :	Activating transcription factor 4
ATP :	Adénosine triphosphate
Bapx1 :	Bagpipe homeobox 1
Cbf β :	core binding factor beta

CDKN1A :	cyclin dependant kinase inhibitor 1A
CDKN1B :	cyclin dependant kinase inhibitoe 1B
BMPs :	Bone morphogenic proteins
BMP- 2 :	Bone morphogenic protein 2
BMP-4 :	Bone morphogenic protein 4
BSP :	Bone sialoprotein:
C/EBP β :	CCAAT/enhancer binding protein β
C/EBP δ :	CCAAT/enhancer binding protein δ
C/EBP γ :	CCAAT/enhancer binding protein γ
CFTR :	cystic fibrosis transmembrane conductance regulator
CPPD :	calcium pyrophosphate dehydrate
CRE :	cAMP response element
CSF1 :	Colony stimulating factor 1
COPI :	Coat complex I
COPII :	Coat complex II
dl :	Décilitre
DlgA :	Discs-large Tumor suppressor
Dlx3 :	Distal-less homeobox 3

Dlx5 :	Distal-less homeobox 5
DMP-1 :	Dentin matrix acidic phosphoprotein 1
ECE-1 :	Endothelin converting enzyme 1
ECE-2 :	Endothelin converting enzyme 2
EDEM :	Endoplasmic reticulum degradation-enhancing alpha-mannosidase –like protein 1
ENPP1 :	Ectonucleoside pyrophosphatase/phosphodiesterase 1
ERAD :	Endoplasmic reticulum-associated degradation
ERE :	Estrogen response element
ERGIC :	ER-Golgi intermediate compartment
ETS1 :	Avian erythroblastosis virus E26 oncogene homolog 1
FGF-2 :	Fibroblast growth factor 2
FGF-4 :	Fibroblast growth factor 4
FGF-8 :	Fibroblast growth factor 8
FGF-18 :	Fibroblast growth factor 18
FGF-23 :	Fibroblast growth factor 23
FGFR1 :	Fibroblast growth factor receptor 1
FGFR2 :	Fibroblast growth factor receptor 2

FGFR3 :	Fibroblast growth factor receptor 3
FGFR4 :	Fibroblast growth factor receptor 4
Fra-1 :	Fos related antigen 1
GADD45 β :	Growth arrest and DNA damage-inducible gene β
GALNT3 :	Polypeptide N-acétylgalactosaminyltransférase 3
GAS6 :	Growth arrest specific gene 6
GRE :	Glucocorticoid response element
Glc :	Glucose
GlcNAc ₂ :	<i>N</i> -acétylglycosamine
Givr1 :	Gibbon ape leukemia virus receptor 1
GPI :	glycosylphosphatidylinositol
GSK-3 :	Glycogen synthase kinase 3
Gy :	Gyro
HHRH :	rachitisme hypophosphatémique héréditaire autosomique avec hypercalciurie
Hox :	Homeobox genes
HPO ₄ ²⁻ :	Hydroxyphosphate
H ₂ PO ₄ ⁻ :	Dihydroxyphosphate

Hyp :	Hypophosphatemic rickets
IGF-1 :	Insulin like growth factor 1
Ihh :	Indian hedgehog
IL-1 :	Interleukine 1
JAK :	Janus kinase
JNK :	Jun kinase
kDa :	kiloDalton
<i>K_m</i> :	Michaelis constant
LEF :	Lymphoid enhancer binding factor
Lmx1 :	Lim homeobox transcription factor 1
Lrp5 :	Low density lipoprotein receptor-related protein 5
Lrp6 :	Low density lipoprotein receptor-related protein 6
Man :	Mannose
MAPK :	Mitogen activated protein kinase
MAPK14 :	Mitogen activated protein kinase 14
mg :	Milligramme
Men1 :	Multiple endocrine neoplasia type 1
MEPE :	Matrix extracellular phosphoglycoprotein

MGP :	Matrix gamma-carboxyglutamic acid
MITF :	Microphthalmia-associated transcription factor
ml :	Millilitre
mM :	Millimolaire
MMP9 :	Matrix metalloprotéinase 9
MMP13 :	Matrix metalloproteinase 13
m _r :	Masse relative
Msx-1 :	Muscle segment homeobox 1
Msx-2 :	Muscle segment homeobox 2
NAB-2 :	NGFIA binding protein 2
NaPi :	transporteurs sodium-phosphate
NaPi1 :	transporteurs sodium-phosphate 1
NaPi2a :	transporteurs sodium-phosphate 2a
NaPi2b :	transporteurs sodium-phosphate 2b
NaPi2c :	transporteurs sodium-phosphate 2c
NaPi3 :	transporteurs sodium-phosphate 3
N-CAM :	Neural cell adhesion molecule

NFATc1 :	Nuclear factor of activated T cells, cytoplasmic, calcineurin dependent 1
NGFIA :	Nerve growth factor-induced clone A
NF- κ B :	Nuclear factor κ B
Ng :	Nanogramme
NHERF 1-4 :	Sodium/hydrogen exchanger regulatory factor
Nm :	Nanomètre
OHO :	Ostéomalacie hypophosphatémique oncogénique
OPN :	Ostéopontine
PACS :	Phosphofurin acidic cluster-sorting protein
Pax-1 :	Paired box gene 1
Pax-9 :	Paired box gene 9
PHEX :	Phosphate regulating gene with homologies to endopeptidases on the X chromosome
Pi :	Phosphate inorganique
PKA :	Protéine kinase A
PKC :	Protéine kinase C
PPAR γ :	peroxisome proliferators activated receptor γ
PPi :	pyrophosphate inorganique

PSD95 :	Post Synaptic Density protein 95
PTH :	Parathyroid hormone
PTHrP :	Parathyroid hormone related peptide
Rac :	GTPase activating protein
Ram1 :	Receptor amphotropic murine retrovirus 1
RANK :	Receptor activator of NF- κ B
RANKL :	Receptor activator of NF- κ B ligand
Rb :	Retinoblastoma
RE :	Réticulum endoplasmique
Rho :	Ras homolog
Runx-1 :	Runt-related transcription factor 1
Runx-2 :	Runt-related transcription factor 2
Runx-3 :	Runt-related transcription factor 3
sFRP-4 :	Secreted frizzled-receptor protein 4
Shank2e :	SH3 and multiple ankyrin repeats domains 2e
Shh :	Sonic Hedgehog
SIBLING :	small integrin-binding ligand, N-glycosylated proteins
Ska-1 :	Skeletal abnormality 1

Smad-1 :	Mothers against decapentaplegic homolog 1
Smad-3 :	Mothers against decapentaplegic homolog 3
Smad-5 :	Mothers against decapentaplegic homolog 5
Smad-8 :	Mothers against decapentaplegic homolog 8
SOX 9 :	SRY-box containing gene 9
STAT1 :	Signal transducer and activator of transcription 1
TASK-3 :	Twik-related acid-sensitive K ⁺ channel 3
TCF :	Transcription factor
TFE3 :	Transcription factor for immunoglobulin heavy-chain enhancer 3
TFEB :	T-cell transcription factor B
TFEC :	T-cell transcription factor C
TGF- β :	Transforming growth factor β
TGN :	<i>Trans</i> -Golgi network
TNF :	Tumor necrosis factor
TNF α :	Tumor necrosis factor α
TRAF1 :	TNF receptor-associated factor 1
TRAF2 :	TNF receptor-associated factor 2

TRAF3 :	TNF receptor-associated factor 3
TRAF5 :	TNF receptor-associated factor 5
TRAF6 :	TNF receptor-associated factor 6
TRAP :	Tartrate-resistant acid phosphatase
UCMA :	Unique cartilage matrix-associated
μM :	Micromolaire
VDR :	Vitamin D receptor
VEGF :	Vascular endothelial growth factor
VEGFR1 :	Vascular endothelial growth factor receptor 1
v-SNARE :	Vesicle- soluble NSF attachment receptor
Wnt :	Wingless-type MMTV integration site family
Wnt-7a :	Wingless-type MMTV integration site family, member 7A
Wwtr1 :	WW-domain containing transcription regulator 1
XLH :	Hypophosphatémie liée au chromosome X
Yes :	Yamaguchi sarcoma viral oncogene
Zo1 :	Zona occludens 1

À mes amours, Mélisa, minou noir et minou beige

Remerciements

Je tiens tout d’abord à remercier mon directeur de recherche, le docteur Guy Boileau de m’avoir accepté dans son laboratoire. Les années passées à le côtoyer m’ont permis de me développer tant du côté scientifique que du côté humain. Ta rigueur scientifique m’a permis de m’améliorer et de devenir un meilleur homme de science. Ta patience et ta gentillesse m’ont été précieuses dans mon développement personnel. Finalement, souhaitons ensemble une coupe Stanley au Canadiens de Montréal dans un avenir rapproché afin que nous puissions trinquer ensemble!

J’aimerais aussi remercier les membres du laboratoire qui ont travaillé avec pendant mes années passées à élucider PHEX. Je tiens particulièrement à remercier Alexandre Benoit, pour ton humour particulier. Je veux également souligner l’apport des deux autres membres du trio infernal, Véronique Bériault et Martin Pellicelli. J’ai toujours dit que nous faisons une équipe d’enfer, et bien, je persiste et signe. De plus, votre apport musical m’aura été d’un plaisir immense. La musique n’étant que le lien entre nos conversations, plus intéressantes les unes que les autres. Il y a aussi les autres, Mélanie, Geneviève, Valérie, mes stagiaires et Maxime Johnson, à ma grande surprise.

Je veux aussi souligner la présence à mes côtés des membres de l’aile A-5. Karine, pour ta mère et me forcer à me dépasser du côté culinaire, Laurent, pour ton côté métrosexuel français (pléonasme, même s’il n’y a qu’un seul mot de vrai là-dedans), Fred, pour les étalons et nos jokes plates à se faire des high fives, Samuel, pour nos discussions de hockey, Marjolaine, pour les clowns, les caniches et ta naïveté rafraîchissante, Jordan, pour ton oncle, l’asso et nos tapes dans les mains pendant les matchs des Carabins. Je veux aussi mentionner l’apport d’autres membres de l’aile A-5 et du département lors de mes études, Demian, Georges, Luc, Vincent, Laurent Doucet, Nicolas Lahaie, Élise et Adrian.

Je veux également remercier d’autres amis ne faisant pas partie de mon univers scientifique, mais qui ont tout de même contribué à préserver ma santé mentale, tout en

détériorant ma santé physique et... mentale!! Tristan, Phil, Max (présent dans deux catégories), David, Charles-Olivier, Patrick, Christian, Daniel, Francis, Guillaume, etc, etc, etc. Merci à tous, je vous aime.

Je veux également remercier mes parents, Ginette et Jean qui m'ont supporté et remonté le moral dans mes phases plus difficiles. Jamais je ne pourrai vous remercier suffisamment pour tout ce que vous avez fait pour moi, c'est incalculable. Votre présence et votre écoute ont été merveilleuses, surtout lorsque je vous expliquais mes projets et mes hypothèses à mes problèmes rencontrés!!! À mon frère jumeau, François, avec lequel je peux parler de sport, assister à des événements sportifs, le battre dans nos pools sportifs, faire du sport (comme le lever du coude) ou bien juste discuter de la vie et de nos nombreux intérêts communs. Merci François. Je veux aussi remercier les autres membres de ma famille, Adrien, Marcelle, Pierre, Françoise, Karine, Coralie, Pascale, Pascal, Benjamin et tous les autres que j'oublie de mentionner.

Je remercie ici toutes les autres personnes qui pourraient se sentir visées ou bien qui se sentent oubliées dans ces remerciements. Sachez que je vous aime et que cette pensée est pour vous!

Finalement, je veux particulièrement remercier ma copine, Mélisa, pour sa présence de tous les instants. Chérie, je te remercie pour toute l'aide que tu m'as apportée au cours de toutes ces années. Ta patience, ta compréhension, ton écoute et tout simplement le fait que tu sois toi. Mon amour, toi seule sais tout ce que représentent ces années d'efforts, de sacrifices et de moments de bonheur. Sans toi, la colline où se trouve cette merveilleuse université aurait été beaucoup plus difficile à grimper chaque jour. Je sais, j'ai fait la même chose pour toi lors de tes deux maîtrises. Tu dois alors te dire que je t'en dois une... Tout est dans l'évaluation quantitative et qualitative de nos diplômes respectifs. Tout compte fait, nous sommes tous deux gagnants sur tous les points de vue puisque nous nous avons... Yé!!!! Bref, merci pour tout et pour terminer, n'oublie pas que je t'aime!!!

Chapitre 1 – Introduction

L'introduction de cette thèse comprend deux parties; l'une présente la revue de la littérature tandis que l'autre expose les objectifs du projet de recherche. Les chapitres suivants sont consacrés aux résultats présentés sous forme d'articles. Deux de ceux-ci traitent de PHEX, une enzyme principalement exprimée dans les os et les dents qui est importante pour la minéralisation. Le premier traite de la régulation du gène *PHEX* par le PTH et le PTHrP et le second traite quant à lui de la localisation de la protéine PHEX dans les vésicules de calcification (VC) et de l'importance de cette localisation pour sa fonction. Le troisième article traite de FGF23, une autre protéine importante dans le métabolisme du phosphate et de son rôle lors de la minéralisation en condition de surexpression.

I) Revue de la littérature

La revue de littérature de cette thèse sera constituée des sections suivantes :

- (1) La minéralisation du tissu osseux.
- (2) L'homéostasie du phosphate et désordres cliniques reliés au phosphate.
- (3) Le transport des protéines vers la membrane plasmique

1) Le tissu osseux

Le tissu osseux est un tissu qui contient environ 99% de nos réserves de calcium et 85% de nos réserves de phosphate sous forme de minéral appelé hydroxyapatite. C'est cet hydroxyapatite qui compose la partie solide de nos os. L'autre partie est la matrice extracellulaire sur laquelle les cristaux d'hydroxyapatite se déposent. Malgré sa nature, le tissu osseux est très dynamique et en constant remaniement. Ce tissu renferme trois types de cellules soit les ostéoblastes, les ostéocytes et les ostéoclastes. Le tissu osseux participe à plusieurs fonctions biologiques qui incluent la locomotion, le support, la protection du cerveau, de la colonne vertébrale, du cœur et des poumons. Il contient aussi les cellules hématopoïétiques dans la moelle osseuse, sert de réservoir de calcium et de phosphate pour l'organisme, participe à la réparation de fractures et finalement, sert de lien d'attache pour les muscles, les ligaments et les tendons.

1.1) Organisation du tissu osseux

De façon macroscopique, le tissu osseux comporte à la fois des parties compactes, l'os compact et des parties composées de nombreuses cavités séparées par de minces trabécules, ce qui constitue alors l'os spongieux. La surface externe de l'os s'appelle le périoste et la surface interne est une fine membrane nommée endoste. Ces deux surfaces comprennent les cellules osseuses, ostéoblastes et ostéoclastes ainsi que les cellules mésenchymateuses. Il existe deux types d'os : les os longs et les os plats. Les os longs sont constitués de deux épiphyses à chaque extrémité et d'une diaphyse qui relie les deux épiphyses. Entre les épiphyses et la diaphyse, une autre structure est présente, la métaphyse, qui correspond en fait à la plaque de croissance. Les os plats ne sont quant à eux constitués que d'une mince couche d'os compact à sa surface séparée par de l'os spongieux au centre. La moelle rouge, comportant les cellules hématopoïétiques est comprise dans l'os spongieux des os plats, mais également dans le canal médullaire ainsi que dans les épiphyses des os longs chez les nouveaux nés. Chez les adultes, le canal médullaire renferme surtout de la moelle jaune, liquide très riche en graisses qui peut se transformer en moelle rouge dans des cas d'anémie grave afin d'augmenter la production de globules rouges.

La structure microscopique de l'os est différente si l'on regarde l'os compact ou l'os spongieux. Malgré son appellation d'os compact, ce tissu possède néanmoins plusieurs cavités afin de laisser passer les vaisseaux sanguins, les nerfs et les vaisseaux lymphatiques. L'unité structurelle de l'os est appelée ostéon et est composée d'un canal central où se situent les vaisseaux sanguins et les neurofibres desservant les cellules osseuses ainsi que de plusieurs lamelles concentriques. Les fibres de collagène de ces lamelles sont parallèles au sein d'une lamelle, mais sont orientées dans des directions

différentes sur deux lamelles adjacentes afin de donner plus de force à l'os. L'os compact est donc un tissu très structuré comparativement à l'os spongieux où des travers osseux sont présents, mais ne présentent pas de formes régulières. Cette irrégularité des travées est due aux stress que subit l'os, elles seront plus épaisses là où les contraintes sont plus importantes.

1.2) L'ossification

L'ossification désigne autant la formation que la croissance des os. Chez l'embryon, ce processus mène à la formation des os et est également appelé ostéogenèse. La croissance osseuse, qui constitue l'autre forme d'ossification, a lieu chez le nouveau né et se poursuit jusqu'à l'âge adulte.

1.2.1) L'ostéogenèse

Il existe différents types d'ossification dépendamment des cellules utilisées. Si les cellules utilisées sont de la lignée ostéoblastique, on assiste à de l'ossification intramembraneuse tandis que l'ossification utilisant les chondrocytes comme échafaud s'appelle quant à elle l'ossification endochondrale. Les premières étapes sont communes aux deux types d'ossification à savoir 1) la migration des cellules vers les lieux où aura lieu l'ostéogenèse, 2) la précondensation où a lieu des interactions épithélio-mésenchymateuses, 3) la condensation et 4) la différenciation des cellules en ostéoblastes (Hall and Miyake 1995; Hall and Miyake 2000). C'est à la phase de différenciation des cellules que résident les différences entre les deux types d'ossification. Ceci sera abordé dans une section ultérieure. La première étape

consiste en la migration des cellules, de la crête neurale crânienne pour les structures de la tête et du mésoderme pour le tissu osseux du reste du corps. Plusieurs molécules sont importantes pour la migration de ces cellules notamment les membres de la famille du « transforming growth factor β (TGF- β) et des « bone morphogenic proteins (BMPs). Les interactions cellulaires entre les différentes couches du mésoderme et de l'ectoderme constituent la deuxième étape. La famille HOX est importante pour cette étape, tout comme FGF-8. À cette étape, les cellules mésenchymateuses sécrètent une matrice extracellulaire riche en hyaluronan et en collagène de type I, ce qui empêche l'agrégation des cellules. L'activité hyaluronidase et conséquemment la diminution d'hyaluronan facilite alors le mouvement des cellules vers le site de condensation (Toole, Jackson et al. 1972; Knudson and Toole 1987). Ces deux premières étapes ne sont pas encore bien connues et peu d'informations sont disponibles. La troisième étape est mieux caractérisée. Elle comprend deux concepts, à savoir la condensation des cellules mésenchymateuses et le « patterning » qui formera les os des différents membres.

1.2.2) Ossification intramembraneuse

L'ossification intramembraneuse est le type d'ossification observé chez les os plats. Après la condensation, les cellules mésenchymateuses se différencient en ostéoblastes et commencent à sécréter une matrice osseuse organique. Ce processus survient à plusieurs endroits dans l'os même s'il existe un point d'ossification principal au niveau de la matrice osseuse. Les points d'ossification grandissent et se fusionnent les uns avec les autres, ce qui emprisonne les vaisseaux sanguins. Cet os précurseur est appelé os fibreux. Dans celui-ci, les fibres de collagène sont organisées de façon irrégulière. Des

cellules mésenchymateuses viennent s'associer sous forme d'une double couche à cet os fibreux afin de former le périoste. Ensuite, les cellules mésenchymateuses de la couche interne se différencient en ostéoblastes, épaississant les travées voisines, ce qui forme une couche osseuse continue. L'os fibreux sera remplacé par de l'os compact. On retrouvera encore de l'os spongieux, car ce ne sont pas toutes les travées qui seront comblées par de l'os compact.

1.2.3) La croissance des os par apposition

Les os croissent également en épaisseur pour les os plats ou, dans le cas des os longs, en diamètre. Ce sont les ostéoblastes, qui se trouvent sous le périoste, qui forment de nouveaux ostéons à la surface de l'os. Cette formation osseuse est généralement accompagnée de résorption osseuse moins vigoureuse, avec un effet net de croissance osseuse.

1.2.4) Ossification endochondrale

L'ossification endochondrale est le type d'ossification utilisé par les os longs. Cette ossification se fait à partir d'un point d'ossification primaire. Les cellules mésenchymateuses vont d'abord former le cartilage hyalin. Elles vont ensuite s'aligner les unes par rapport aux autres en formant une tige de chondrocytes. À la suite de la condensation des cellules de la crête neurale, les cellules en bordure de la tige de cartilage forment le périchondrium et sécrètent une gaine osseuse autour de la tige de cartilage hyalin. Cette gaine est sécrétée par les ostéoblastes du point d'ossification primaire. Une portion des

chondrocytes de la tige de cartilage va s'hypertrophier et la matrice cartilagineuse sera calcifiée pour ainsi former la diaphyse des os longs. Suite à l'hypertrophie des chondrocytes, ceux-ci vont entrer en apoptose et laisser des cavités dans le cartilage. L'invasion des cavités sera faite par des vaisseaux sanguins et les ostéoblastes rempliront les cavités en sécrétant de la matrice extracellulaire ainsi que de l'os pour former de l'os spongieux. Les ostéoclastes vont par la suite dégrader cet os spongieux pour former le canal médullaire. Finalement, des points d'ossification secondaires seront créés par la calcification du cartilage au niveau des épiphyses. Les ostéoblastes vont terminer la calcification des épiphyses de la même façon que pour la diaphyse à l'exception qu'il n'y aura pas de canal médullaire de formé. Des cellules hématopoïétiques sont comprises dans la cavité médullaire et représentent la source principale de ce type de cellules lors de la vie adulte de l'organisme. Ce mode d'ossification est responsable de la croissance en longueur des os longs.

1.2.4.1 Événements moléculaires de l'ossification endochondrale

Plusieurs événements moléculaires ont été élucidés quant au contrôle de la différenciation des chondrocytes et du processus de leur division, hypertrophie et apoptose menant à la croissance en longueur lors de l'ossification endochondrale. Les cellules du mésenchyme se différencient en chondrocytes grâce à SOX9. Des études où le gène de *Sox9* a été inactivé montrent qu'il est essentiel pour la différenciation des chondrocytes (Bi, Deng et al. 1999; Akiyama, Chaboissier et al. 2002). De plus, SOX9 régule plusieurs gènes essentiels à la fonction des chondrocytes tels que le collagène de type II et l'aggrecan (Lefebvre, Huang et al. 1997; Bridgewater, Lefebvre et al. 1998; Sekiya, Tsuji et al. 2000). Les chondrocytes, une fois différenciés, sécrètent du

collagène de type II ainsi que des protéoglycans dont l'aggrecan. Les chondrocytes prolifèrent et permettent la formation de la colonne de chondrocytes. À cette étape, RUNX-2 est réprimé. Cette répression est effectuée par BAPX1, qui inhibe l'expression de RUNX-2. Lorsque les chondrocytes deviennent hypertrophiques, il y a une régulation négative de BAPX1, ce qui fait en sorte que l'expression de RUNX-2 est augmentée, contribuant au remplacement des chondrocytes hypertrophiques par des ostéoblastes. Les cellules s'hypertrophient donc, arrêtent de proliférer et synthétisent à partir de cette étape du collagène de type X. Les signaux contrôlant l'arrêt de prolifération et l'hypertrophie des chondrocytes sont médiées par RUNX-2 comme mentionné précédemment. Il a été démontré que des souris ayant subi une ablation génique pour *Runx-2* montrent une diminution de chondrocytes hypertrophiques par rapport à des souris sauvages (Inada, Yasui et al. 1999) et que la double ablation pour *Runx-2* et *Runx-3* cause une absence totale de chondrocytes (Yoshida, Yamamoto et al. 2004). D'autres gènes sont importants dans le contrôle de la prolifération et de l'hypertrophie des chondrocytes. Deux de ceux-ci sont Indian hedgehog (IHH) et le PTHrP. Le PTHrP a pour rôle, lors de la liaison à son récepteur, d'augmenter la prolifération des chondrocytes à l'extrémité des os longs de façon paracrine. Le PTHrP est synthétisé par les chondrocytes en prolifération et garde ces cellules sous leur forme proliférative. Lorsque ces chondrocytes sont trop éloignés des chondrocytes en prolifération, la signalisation par le PTHrP n'est plus perçue et les chondrocytes deviennent alors hypertrophiques et sécrètent alors IHH, puisque le PTHrP ne peut plus inhiber la synthèse d'ihh par les chondrocytes hypertrophiques. IHH, via une boucle de rétroaction augmente la prolifération des chondrocytes et stimule la production de PTHrP à l'extrémité des os longs au niveau des chondrocytes hypertrophiques. IHH peut également agir sur les cellules préchondriales afin de stimuler la croissance de

l'os en épaisseur. Cette boucle de rétroaction a été vérifiée chez des souris ayant subi l'ablation du gène pour le récepteur au *Pth/Pthrp* (*PTHR*). Les chondrocytes peuvent donc sécréter *Ihh* plus près de l'extrémité des os, par manque de signalisation du PTHrP, ce qui fait en sorte que IHH est produit et augmente l'expression de PTHrP, amenant une augmentation de la longueur de la colonne de chondrocytes prolifératifs. Si ces cellules souches sont inactivées à la fois pour le gène *Pthr* ainsi que pour *Ihh*, l'hypertrophie prématurée des chondrocytes survient, mais les niveaux de PTHrP ne sont pas augmentés, ce qui fait en sorte que la longueur de la colonne de chondrocytes prolifératifs est normale (Chung, Lanske et al. 1998; Chung, Schipani et al. 2001; Kronenberg 2003). IHH est aussi associé à une augmentation de l'expression de la cycline D1 au niveau du cycle cellulaire, faisant en sorte de favoriser la prolifération des chondrocytes (Long, Zhang et al. 2001). Ces protéines sont donc importantes pour la phase proliférative des chondrocytes.

D'autres protéines sont importantes pour la phase proliférative et hypertrophique des chondrocytes, par exemple les membres de la famille des BMP et des Fibroblast growth factors (FGFs). Les FGFs ont un effet suppressif sur la prolifération des chondrocytes via la voie de signalisation JAK/STAT1, ce qui amène les chondrocytes sous leur forme hypertrophique (Sahni, Ambrosetti et al. 1999). D'ailleurs, les récepteurs FGFR1, FGFR2 et FGFR3 sont exprimés au niveau des chondrocytes préhypertrophiques, hypertrophiques, ainsi qu'au niveau des cellules préchondriales, respectivement. Des études semblent démontrer que l'effet des FGFs serait dû au membre 18. Des souris ayant subi l'ablation du gène *Fgf-18* montrent le même phénotype que les souris ayant subi l'ablation du récepteur *Fgfr3*, à savoir une augmentation de la prolifération des chondrocytes (Deng, Wynshaw-Boris et al. 1996; Liu, Xu et al. 2002; Ohbayashi, Shibayama et al. 2002). Les membres de la famille des BMPs ont quant à eux une implication sur la

prolifération des chondrocytes par la voie des smads. Smad 1, 5 et 8 ont un effet positif sur la prolifération des chondrocytes (Pathi, Rutenberg et al. 1999; De Luca, Barnes et al. 2001; Minina, Wenzel et al. 2001). FGFs et BMPs possèdent donc une activité inverse sur la prolifération des chondrocytes via une augmentation de l'expression d'ihh par les BMPs (Minina, Kreschel et al. 2002) et une diminution par les FGFs (Liu, Xu et al. 2002).

1.3) Les composantes cellulaires du tissu osseux

La formation des os par les ostéoblastes est continuellement contrebalancée par une résorption de ces mêmes os, par les ostéoclastes. Les ostéocytes sont également présents au niveau du tissu osseux et sont considérés comme le stade de différenciation ultime des ostéoblastes.

1.3.1) Les cellules de la lignée ostéoblastique

Les cellules de la lignée ostéoblastique se différencient à partir de cellules pluripotentes d'origine mésenchymateuse. Elles donnent lieu aux cellules ostéoprogénitrices commises à la lignée ostéoblastique mais encore non-différenciées, aux pré-ostéoblastes, aux ostéoblastes, puis finalement aux ostéocytes tel que présenté la Figure 1.

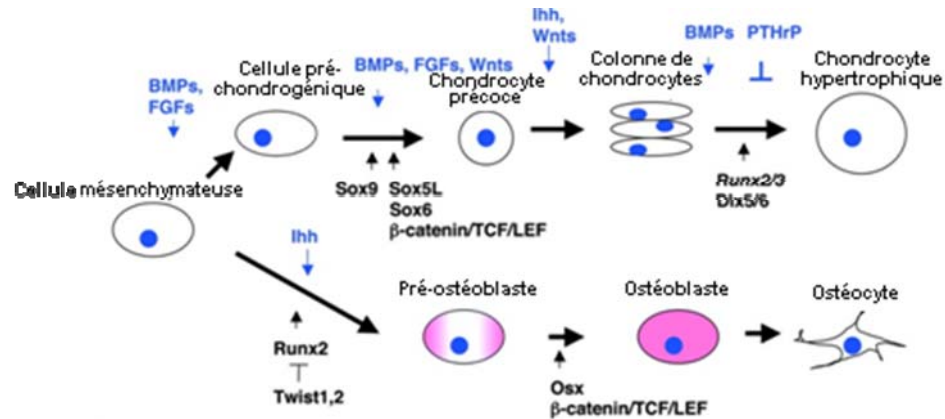


Figure 1 : Différenciation des lignées ostéoblastiques et ostéoclastique (Kobayashi and Kronenberg 2005)

1.3.1.1) Les pré-ostéoblastes

Les pré-ostéoblastes sont des cellules d'origine mésenchymateuses commises à devenir des ostéoblastes. Elles possèdent la capacité de se diviser, contrairement aux ostéoblastes matures. Elles possèdent une activité phosphatase alcaline moindre que les ostéoblastes. Ces cellules en prolifération ont un profil d'expression de gènes différents des ostéoblastes matures. Par exemple, elles expriment de façon plus abondante certains gènes relatifs à la croissance comme c-FOS ou c-MYC. Certains gènes codant pour des protéines de la matrice extracellulaire comme le collagène de type I ou la fibronectine peuvent être exprimés par les pré-ostéoblastes mais sont avec le temps remplacés lors de la différenciation des pré-ostéoblastes en ostéoblastes par des gènes tributaires de la minéralisation osseuse à proprement parler comme l'ostéocalcine ou l'ostéopontine (Komori 2006).

1.3.1.2) Les ostéoblastes

Les ostéoblastes se retrouvent sur les surfaces internes et externes des os. Les cellules de la lignée ostéoblastique sont responsables de la synthèse des cristaux d'hydroxyapatite formant l'os et de la matrice extracellulaire sur laquelle se déposent ces cristaux. Les ostéoblastes sont des cellules de forme cuboïdale, formant une bordure au niveau de la surface de l'os. Ces cellules sont hautement polarisées, le côté apical comportant plusieurs prolongements cytoplasmiques et faisant des connexions avec les autres ostéoblastes ainsi que les ostéocytes. Le côté apical est celui où est sécrété la matrice extracellulaire ainsi que les cristaux d'hydroxyapatite. Le côté basal est non-sécréteur. Le côté apical des ostéoblastes fait donc face à la matrice extracellulaire non-minéralisée que l'on appelle ostéoïde. D'autres cellules, les cellules bordantes de l'os sont également retrouvées à la surface des os. Ces cellules sont plutôt aplaties, possèdent peu d'organelles et ont une activité de synthèse pauvre. Elles sont tout de même des ostéoblastes puisqu'elles participent à la production de matrice extracellulaire et à la formation de cristaux d'hydroxyapatite. Les ostéoblastes possèdent un appareil de Golgi bien développé pour la sécrétion des protéines de la matrice extracellulaire. D'ailleurs, le collagène de type I représente environ 20% du contenu total des protéines produites par les ostéoblastes. Une caractéristique importante d'un ostéoblaste mature et qui peut être mesurée est son activité phosphatase alcaline. Les ostéoblastes produisent une quantité importante de phosphatase alcaline, une protéine essentielle à la formation osseuse. Les connexions entre les cellules sont de type « gap junction » (Doty 1981) et sont très importantes pour la coordination entre les cellules lorsque des signaux de formation ou résorption osseuse sont présents. Plusieurs cadhérines sont présentes à la surface des ostéoblastes, comme la N-Cadhérine, qui est importante non seulement dans les connexions cellule-cellule, mais aussi pour la signalisation

par BMP-2, lors de la différenciation des cellules ostéoprogénitrices (Hay, Lemonnier et al. 2000). D'autres protéines synthétisées par les ostéoblastes comme les intégrines sont utiles à l'établissement de contact entre les cellules et également pour coupler les cellules à la matrice extracellulaire. Les intégrines $\alpha 1\beta 1$, $\alpha 1\beta 2$, $\alpha 3\beta 1$ et $\alpha 2\beta 1$ en font partie (Bennett, Moffatt et al. 2001). Les ostéoblastes possèdent plusieurs récepteurs à leur surface, par exemple le récepteur pour le PTH/PTHrP, pour certaines cytokines ou les prostaglandines.

Le processus de minéralisation, selon les observations faites *in vitro*, a été divisé en trois parties : 1) la prolifération, 2) la déposition de matrice extracellulaire et 3) la minéralisation. Chacune des étapes est accompagnée par des changements dans le profil d'expression des gènes par les ostéoblastes. Ces étapes seront abordées dans une section ultérieure. De même, une section de cette thèse sera dédiée à la fonction des différentes protéines de la matrice extracellulaire et des autres protéines nécessaires à la minéralisation qui sont exprimées lors de ces étapes.

Finalement, l'ostéoblaste joue également un rôle, de concert avec les ostéoclastes, dans la résorption osseuse. Les ostéoblastes semblent en effet essentiels à la maturation et la différenciation des ostéoclastes ainsi qu'à la régulation de l'activité de ces mêmes ostéoclastes. Les ostéoblastes sécrètent de l'ostéoprotégérine, un inhibiteur de l'ostéoclastogénèse et possèdent également des récepteurs pour le RANKL, le PTH/PTHrP et la vitamine D, qui sont des facteurs promouvant l'activité des ostéoclastes. Les ostéoblastes produisent également le colony-stimulating factor 1 (CSF1), un facteur qui participe à l'ostéoclastogénèse (Karsenty and Wagner 2002).

1.3.1.3) Les ostéocytes

Les ostéocytes sont des ostéoblastes qui sont enchâssés dans le tissu calcifié et alignés dans l'os tant trabéculaire que cortical. L'activité métabolique des ostéocytes est moindre comparativement aux ostéoblastes. On peut dire que les ostéocytes sont des ostéoblastes ayant atteint leur niveau de différenciation ultime. Les ostéocytes possèdent de nombreuses connexions cytoplasmiques avec les autres cellules environnantes afin d'assurer leur survie (Burger and Klein-Nulend 1999). Étant emmurés dans la matrice calcifiée, ils sont privés des nutriments essentiels pouvant leur parvenir via la circulation sanguine (Aarden, Burger et al. 1994). Ce sont donc les connexions entre cellules, dont des ostéoblastes qui leur assurent l'apport en nutriments nécessaires pour leur survie. Les ostéocytes, contrairement aux ostéoblastes, ont une activité phosphatase alcaline faible. Ils expriment cependant une grande quantité d'ostéocalcine et quelques protéines de la matrice cellulaire qui sont impliquées dans l'établissement d'extensions cellulaires. Ces cellules possèdent des jonctions cellulaires de type Gap, composées principalement de la protéine connexin-43 (Schiller, Mehta et al. 1992). La fonction réelle des ostéocytes n'a pas encore totalement été élucidée, bien que ces cellules représentent le type cellulaire le plus abondant de l'os (Franz-Odenaal, Hall et al. 2006). Le peu de connaissances des ostéocytes provient probablement fait que peu de modèles de cellules en cultures existent pour étudier les ostéocytes. Les ostéocytes auraient besoin d'un syncytium formé par la connexion entre les cellules, et à la membrane extracellulaire par les intégrines et la Focal Adhesion kinase (FAK) (Plotkin, Manolagas et al. 2007; Plotkin, Lezcano et al. 2008). Parmi les marqueurs des ostéocytes, on peut retrouver DMP1 et FGF23 (Toyosawa, Shintani et al. 2001; Feng, Ward et al. 2006; Lorenz-Depiereux, Bastepe et al. 2006). Ces deux protéines seront traitées plus en détail dans des sections

subséquentes. Pour le moment, on peut avancer que ces protéines sont importantes dans la régulation du phosphate.

1.3.1.3.1) Fonction des ostéocytes

Il a été montré que les ostéocytes pourraient être importants pour le maintien osseux. La sclérostine est une autre protéine exprimée par les ostéocytes. Cette protéine a été montrée comme pouvant inhiber la formation osseuse en agissant comme un antagoniste sur la voie des Wnt et sur les BMPs au niveau des ostéoblastes (Winkler, Sutherland et al. 2003; van Bezooijen, Roelen et al. 2004). Cette inhibition se ferait par la liaison de la sclérostine au récepteur LRP5 (Veverka, Henry et al. 2009). La sclérostine est une cible du PTH. Il a été montré qu'une expression constitutive du récepteur au PTH dans les ostéocytes diminue de façon drastique l'expression de la sclérostine, ce qui a un effet sur la densité osseuse (O'Brien, Plotkin et al. 2008). Des souris ayant été inactivées pour le gène *Sost*, la sclérostine, montrent une augmentation de leur densité osseuse (Li, Ominsky et al. 2008). De plus, des mutations de LRP5 dans des cas de haute densité osseuse montre une efficacité de liaison à la sclérostine diminuée (Balemans, Pters et al. 2008). Des études ont également montré que le nombre d'ostéocytes diminuait avec l'âge. De plus, des études établissent un lien entre la diminution du nombre d'ostéocytes lors de la ménopause ou lors de traitements favorisant le catabolisme osseux comme par exemple des traitements aux glucocorticoïdes (Tomkinson, Reeve et al. 1997; Weinstein, Jilka et al. 1998; Qiu, Rao et al. 2003). Il a donc été proposé que cette diminution en ostéocytes lors de ces actions résulterait en une fragilité accrue des os, menant à une augmentation des fractures (Verborgt, Gibson et al. 2000; Hazenberg, Taylor et al. 2007). La fonction des ostéocytes a pu être mise en valeur grâce à l'établissement d'une lignée de souris où les ostéoclastes ont été supprimés. Ceci a été accompli par la toxine diphtérique et du système

TRECK (Toxin receptor-mediated conditional knockout). En utilisant un promoteur d'un gène spécifiquement exprimé dans les ostéocytes couplé au récepteur de la toxine diphtérique, il est possible, lorsque l'on injecte cette même toxine de tuer de façon spécifique les cellules exprimant ledit récepteur (Saito, Iwawaki et al. 2001; Tatsumi, Ishii et al. 2007). Ce groupe a observé. Peu de temps après l'injection de toxine, les ostéoclastes ont envahi l'os cortical, ce qui laisse suggérer que les ostéocytes pourraient avoir comme fonction de limiter la résorption osseuse provenant des ostéoclastes. Ils ont aussi montré des défauts dans la minéralisation induite par les ostéoblastes, laissant également suggérer que les ostéocytes pourraient réguler la formation osseuse induite par les ostéoblastes. D'autres études ont aussi montré que les ostéocytes peuvent sécréter des facteurs importants pour l'ostéoclastogénèse à des sites de dommages (Heino, Kurata et al. 2009). Bref, ce sont les deux voies principales de l'homéostasie de l'os. La formation par les ostéoblastes et la dégradation par les ostéoclastes, qui semblent affectées. Les souris ne possédant plus d'ostéocytes sont également plus prônes aux fractures, et ce, même à un jeune âge, ce qui laisse supposer que les ostéocytes peuvent être importants durant le vieillissement. Les ostéocytes sont donc d'une importance cruciale pour le maintien de la masse osseuse. Ces concepts récents montrent en évidence que des cellules ayant un niveau de synthèse protéique faible et enchâssé dans l'os peuvent avoir un effet, par leur communication avec les ostéoblastes et les ostéoclastes, un effet sur la synthèse ou la dégradation osseuse.

1.3.1.3.2) La mécanotransduction

Les ostéocytes pourraient également avoir un rôle dans la mécanotransduction de l'os, un remodelage important à l'homéostasie osseuse. Le groupe de Ikeda a montré que l'absence d'ostéocytes empêchait la

perte osseuse lorsque les souris sont suspendues par leur queue pour une période d'une semaine. Ceci prouve que les ostéocytes seraient responsables de la perte osseuse lorsque les mécano-senseurs ne sont pas stimulés, lorsque la souris est suspendue. Cette voie passerait par l'interaction de RANKL (Tatsumi, Ishii et al. 2007). L'absence de forces de méchnotransduction ferait en sorte que les ostéocytes entreraient en apoptose, médié par des niveaux diminués d'oxyde nitrique ou de prostaglandine (Burger, Klein-Nulend et al. 2003; Bonewald and Johnson 2008). Les ostéocytes sont des cellules de choix agissant comme senseurs de la méchanotransduction. Il a été montré que leur forme faisait en sorte qu'elles étaient plus sensibles à la déformation de leurs membranes et qu'elles étaient orientées en direction de la charge à soutenir (Bacabac, Mizuno et al. 2008; Vatsa, Breuls et al. 2008). La sclérostine, mentionnée précédemment a aussi été montrée comme étant régulée par la méchanotransduction. En effet, une stimulation mécanique peut diminuer l'expression de la sclérostine, ce qui cause conséquemment une augmentation de la densité osseuse. À l'inverse, la suspension, ce qui cause une absence de force appliquée cause une augmentation de l'expression de la sclérostine (Lin, Jiang et al. 2009; Moustafa, Sugiyama et al. 2009). Les ostéocytes seraient donc d'une importance capitale dans le maintien de la densité osseuse.

1.3.1.4) Embryologie de la lignée ostéoblastique

Les cellules de la lignée ostéoblastique sont formées soit des cellules du mésoderme, qui donne naissance aux os plats, soit des cellules ectodermiques de la crête neurale qui donnent naissance aux os longs. Les cellules de la crête neurale donnent également naissance au cartilage, aux odontoblastes ainsi qu'au tissu conjonctif du squelette craniofacial (Tuan, Boland et al. 2003). Dans les deux cas, ces ostéoblastes proviennent de cellules multipotentes capables aussi

de donner naissance aux fibroblastes, myoblastes et aux adipocytes (Grigoriadis, Heersche et al. 1988). Le processus de différenciation n'est pas encore élucidé complètement. Cependant, les cellules progénitrices se commettent en lignées ostéochondrogéniques et par la suite en lignées ostéogéniques. Un schéma de la différenciation est présenté à la figure 2.

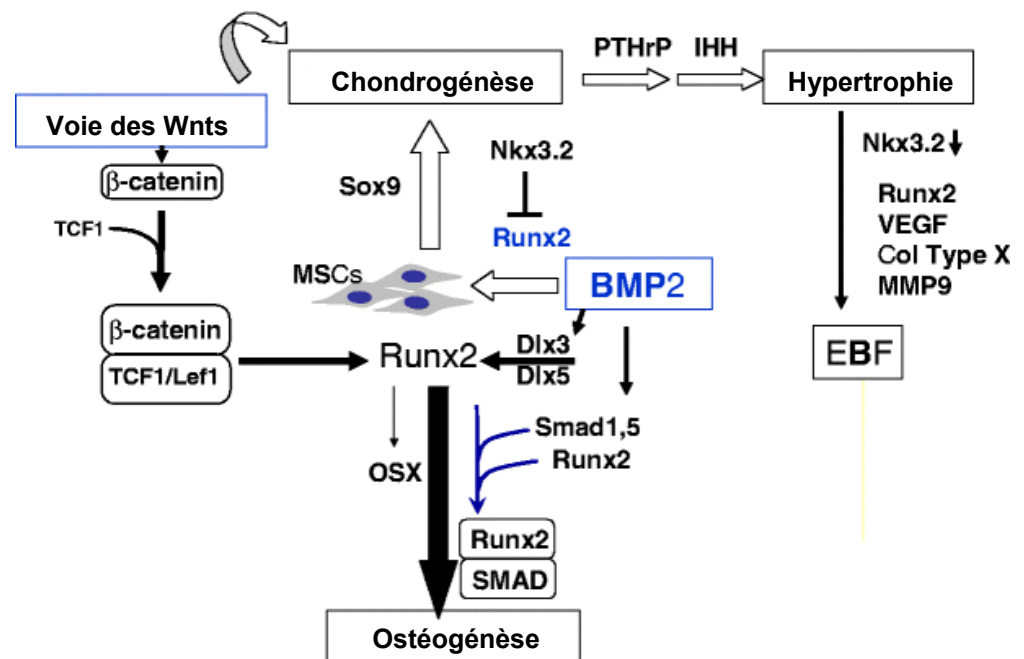


Figure 2 : La signalisation lors de la chondrogénèse et de l'ostéogénèse (Lian, Stein et al. 2006).

1.3.1.5) Différenciation des ostéoblastes

Trois familles de gènes sont importantes pour la différenciation des cellules mésenchymateuses en ostéoblastes. Celles-ci sont la famille Runx, Ostérix ainsi que Wnt. Une autre section présentera les autres facteurs impliqués dans la différenciation des cellules mésenchymateuses en ostéoblastes.

1.3.1.5.1) La famille Runx

Le gène le plus important pour la différenciation des cellules mésenchymateuses en ostéoblastes est sans contredit *Runx-2*. RUNX-2 possède également un rôle dans la différenciation des chondrocytes où certaines notions concernant le rôle de RUNX-2 dans ce processus seront aussi abordées. La famille *Runx* est composée de trois gènes, appelés *Runx-1*, 2 et 3. Ces gènes codent pour des facteurs qui montrent tous un domaine runt qui se lie à l'ADN et qui peuvent former des hétérodimères avec CBF β , un co-activateur transcriptionnel. RUNX-1 est important pour la différenciation des cellules souches, RUNX-3 pour la croissance des cellules épithéliales gastriques, RUNX-1 et 3 pour le développement des thymocytes et finalement, RUNX-2 et 3, sont importants pour la maturation des chondrocytes lors de l'ossification endochondrale. RUNX-3 inhibe également RUNX-1 dans les phases tardives de la minéralisation (Soung do, Dong et al. 2007). RUNX-2 est exprimé dans les chondrocytes avant le début de la formation osseuse au jour E9.5 (Ducy, Zhang et al. 1997). Il existe par épissage alternatif deux formes de la protéine RUNX-2 appelées RUNX-2 de type I où c'est le premier exon qui fait office d'extrémité N-terminale comparativement à RUNX-2 de type II où l'extrémité N-terminale est plutôt composée du deuxième exon. Des études d'ablation génique de *Runx-2* chez la souris ont démontré que l'ossification tant endochondrale qu'intramembraneuse sont complètement absentes (Komori, Yagi et al. 1997).

Ceci est dû à une absence complète d'ostéoblastes. RUNX-2 active la transcription de plusieurs gènes importants pour la fonction des ostéoblastes comme par exemple le collagène 1 α 1, l'ostéopontine, l'ostéocalcine, et la BSP (Komori 2005). Une autre cible de RUNX-2 est GADD45 β (Ijiri, Zerbini et al. 2005), qui a pour rôle de réguler l'expression de MMP13, qui est une protéine exprimée par les chondrocytes hypertrophiques terminaux (Colnot, Lu et al. 2004). Des études d'ablation génique de *Mmp13* chez la souris montrent un délai dans l'ossification endochondrale (Inada, Wang et al. 2004). RUNX-2 aurait aussi un rôle antiprolifératif sur des cellules progénitrices non-différenciées (Pratap, Galindo et al. 2003).

D'autre part, l'expression continue de RUNX-2 a aussi un effet sur la différenciation. En effet, la surexpression de RUNX-2 de type II sous le promoteur du collagène 1 α 1 chez la souris cause de l'ostéopénie et des fractures (Liu, Toyosawa et al. 2001; Geoffroy, Kneissel et al. 2002). On observe aussi des problèmes au niveau de la différenciation en ostéoblastes matures et une incapacité des ostéoblastes à se transformer en ostéocytes (Kanatani, Fujita et al. 2006). L'expression prolongée de RUNX-2 maintient donc les ostéoblastes sous une forme immature les empêchant d'atteindre leur maturité complète. RUNX-2 a également pour cible CDKN1A et CDKN1B, deux inhibiteurs des CDK (Westendorf, Zaidi et al. 2002; Thomas, Johnson et al. 2004). Ceci cause un effet anti-prolifératif au niveau des pré-ostéoblastes, ce qui aiderait alors à promouvoir la différenciation des pré-ostéoblastes en ostéoblastes. RUNX-2 se lie à l'ADN sous forme d'hétérodimère. De plus, Runx-2 a besoin de son corégulateur, CBF β , pour lier l'ADN (Yoshida, Furuichi et al. 2002). Plusieurs protéines peuvent potentialiser l'activité transcriptionnelle de RUNX-2 comme C/EBP β , C/EBP δ , ETS1, MEN1, SMAD1, SMAD5, AES, RB, WWTR1 et p204 (Komori 2005; Liu, Chang et al. 2005). D'autres partenaires ont plutôt pour rôle de réduire l'activité transcriptionnelle de RUNX-2 menant à la

différenciation finale en ostéoblastes comme par exemple C/EPB γ , DLX3, MSK2, PPAR γ , Twist, STAT1, SMAD3 et YES (Kang, Alliston et al. 2005; Komori 2005). ATF4 est une autre protéine qui s'associe à RUNX-2 et qui promeut la différenciation des ostéoblastes (Xiao, Jiang et al. 2005). Les souris ayant subi une inactivation du gène *ATF4* montrent cependant un phénotype de faible densité osseuse léger et ont également un retard de la différenciation des ostéoblastes et conséquemment, de la minéralisation osseuse (Yang, Matsuda et al. 2004).

1.3.1.5.2) Ostérix

Ostérix est aussi un gène très important pour la différenciation des ostéoblastes. Ostérix fait partie de la famille SP de facteurs de transcription. Tout comme pour Runx-2, il a été démontré que l'ablation génique du gène *Ostérix* chez des souris menait à une absence d'ostéoblastes (Nakashima, Zhou et al. 2002). Cependant, les souris *Ostérix* $-/-$ ont une expression normale de RUNX-2, ce qui n'est pas le cas pour les souris où le gène *Runx-2* a été inactivé qui présentent une absence d'Ostérix. Ceci démontre que RUNX-2 est essentiel pour l'expression d'Ostérix et qu'Ostérix se situe en aval de RUNX-2 dans le processus de différenciation des ostéoblastes et des chondroblastes en chondrocytes (Nakashima, Zhou et al. 2002). Ostérix a également été démontré comme pouvant promouvoir la prolifération des cellules progénitrices (Kim, Kim et al. 2006).

1.3.1.5.3) WNTs

La signalisation par les WNTs est une autre voie importante. Ceux-ci activent les récepteurs de la famille Frizzled et les co-récepteurs LRP5/6. Ils causent une stabilisation de la β -caténine par l'inhibition de sa phosphorylation par la GSK-3 kinase. La β -caténine peut donc se transloquer au

noyau et activer la transcription de gènes en se liant aux facteurs de transcription LEF/TCF qui régulent entre autres l'expression des WNTs, causant une boucle de rétroaction (Glass and Karsenty 2006). L'importance de cette voie de signalisation a été démontrée par l'inactivation du gène de la *β-caténine*. Il a été démontré que la différenciation en ostéoblastes avait besoin de la *β-caténine* puisque la différenciation des cellules progénitrices s'arrêtait au niveau des pré-ostéoblastes chez ces souris qui n'expriment pas la *β-caténine*. Les souris ayant subi une ablation génique de la *β-caténine* ne possèdent donc pas d'ostéoblastes (Day, Guo et al. 2005; Hu, Hilton et al. 2005). De plus, on peut observer la présence de RUNX-2, mais pas d'Ostérix (Hill, Spater et al. 2005). L'activation et l'inactivation par mutations du co-récepteur des WNTs, LRP5, causent respectivement une augmentation et une diminution du nombre d'ostéoblastes, avec une densité osseuse plus grande et plus faible comparativement à des gens ne possédant pas ces mutations (Boyden, Mao et al. 2002; Little, Recker et al. 2002; Ai, Heeger et al. 2005). Ces phénotypes sont en accord avec l'absence d'activation des autres gènes de cette voie de signalisation. Ces effets seraient dus à WNT10b, qui augmentent l'expression de DLX5, RUNX-2 et Ostérix (Bennett, Longo et al. 2005), des gènes importants pour la différenciation des pré-ostéoblastes en ostéoblastes.

1.3.1.5.4) Autres facteurs importants

D'autres voies de signalisation sont aussi importantes comme par exemple la voie des BMPs, impliquée dans la différenciation des ostéoblastes. Par exemple, la surexpression de BMP-2 dans les cellules C2C12 augmente l'expression de RUNX-2 tout en permettant leur différenciation en ostéoblastes (Afzal, Pratap et al. 2005). BMP-2 favorise l'hétérodimérisation de RUNX-2 avec les SMADs. En accord avec cette affirmation, un phénotype de dysplasie cléidocraniale a été observé chez des patients possédant des mutations brisant

l'interaction de SMAD et RUNX-2 (Zhang, Yasui et al. 2000; Zhang, Yasui et al. 2000; Kang, Alliston et al. 2005). De plus, BMP-2 induit l'hétérodimérisation de RUNX-2 avec MSX2, ce qui prévient l'ossification des cellules non osseuses et réprime également des gènes importants pour la fonction des ostéoblastes matures (Hassan, Javed et al. 2004; Yoshizawa, Takizawa et al. 2004). BMP-2 induit également l'hétérodimérisation de RUNX-2 avec DLX3 et DLX5, qui sont importants pour l'expression de gènes importants pour la différenciation de la lignée ostéoblastique (Tadic, Dodig et al. 2002; Hassan, Javed et al. 2004). Ceci indiquerait donc que BMP-2 aurait pour rôle d'empêcher l'expression de gènes exprimés par les ostéoblastes matures au début de la différenciation via MSX2 et plus tard, de pousser les pré-ostéoblastes à se différencier en ostéoblastes via DLX3 et DLX5 en exprimant des gènes nécessaires à la fonction des ostéoblastes. L'expression de RUNX-2 est également modulée par ces facteurs de transcription. Par exemple, MSX2 la diminue tandis que DLX3 et DLX5 l'augmentent (Shirakabe, Terasawa et al. 2001; Lee, Kim et al. 2005). MSX2, DLX3 et DLX5 ont donc un rôle par leur hétérodimérisation à RUNX-2 sur la différenciation des ostéoblastes en plus de réguler directement l'expression de RUNX-2.

1.3.2) Les cellules de la lignée ostéoclastique

Les ostéoclastes sont les cellules responsables de la résorption osseuse. Elles sont donc des cellules très importantes pour l'homéostasie osseuse. En effet, certaines maladies comme l'ostéoporose, peuvent montrer une activité ostéoclastique accrue résultant en une dégradation de l'os.

1.3.2.1) Fonction des ostéoclastes

Les ostéoclastes sont des cellules volumineuses et hautement polarisées. Les ostéoclastes sont multinucléés et peuvent posséder jusqu'à 30 noyaux. Ils possèdent une membrane ondulée, qui fait office d'organelle de résorption osseuse. Cette membrane comprend plusieurs pompes à protons (H^+ ATPases) qui transportent des ions H^+ dans l'environnement où a lieu la résorption. La formation de cette membrane en crêtes est dépendante du contact avec l'os et n'est apparente qu'au moment où les ostéoclastes dégradent la matrice osseuse. Les ostéoclastes ont une demi-vie de 6 à 10 jours et ont donc besoin d'être constamment renouvelés afin d'effectuer leur activité (Loutit and Townsend 1982). Les ostéoclastes dégradent le minéral de l'os tout comme la matrice extracellulaire. L'attachement de l'ostéoclaste avec l'os se fait grâce à une intégrine, l'intégrine $\alpha\beta3$ (McHugh, Hodivala-Dilke et al. 2000). Des souris ayant subies une ablation génique de l'intégrine $\beta3$ ont des ostéoclastes dysfonctionnels et se montrent ostéopétrotiques (McHugh, Hodivala-Dilke et al. 2000). L'ostéoclaste, grâce à cette intégrine, peut alors faire un pont entre la matrice extracellulaire et les filaments d'actine. L'intégrine $\alpha\beta3$ reconnaît également les protéines de la matrice extracellulaire contenant des motifs RGD (Aubin 1992). L'attachement se fait dans des domaines spécialisés de la membrane plasmique, appelés podosomes. Une fois attachées à l'os, les pompes à protons sont amenées à la membrane plasmique dans des vésicules et s'insèrent dans la membrane en crête où a lieu la résorption. L'ostéoclaste acidifie le microenvironnement de l'interface os-cellule et c'est cette acidification du microenvironnement qui est la cause de la dégradation du minéral. Pour ce qui est de la dégradation de la matrice extracellulaire, cette fonction est remplie par la cathepsine K, qui est efficace à un pH acide (Gelb, Shi et al. 1996). La cathepsine K est exprimée par les ostéoclastes grâce aux facteurs de transcription de la famille MITF (Motyckova, Weilbaecher et al.

2001). Des souris dont le gène de la cathepsine K a été inactivé ou des patients ayant des mutations dans ce même gène sont affectés d'une maladie appelée pycnodysostose. Le phénotype de cette maladie en est un de densité osseuse plus élevée comparativement aux sujets normaux ou aux souris de type sauvage malgré le fait que l'élément minéral de l'os est métabolisé correctement (Gelb, Shi et al. 1996; Saftig, Hunziker et al. 1998). En effet, ce sont les fibrilles de collagène qui ne sont pas dégradées, amenant le phénotype observé. Les composantes principales d'un ostéoclaste sont résumées à la figure 3.

1.3.2.2) Embryologie des ostéoclastes

Les ostéoclastes sont des cellules issues de la famille des monocytes et des macrophages de la moelle osseuse (Fujikawa, Quinn et al. 1996). La différenciation des cellules de la lignée monocytique en précurseurs ostéoclastiques se fait principalement par le facteur de transcription PU.1 et par facteurs de la famille MITF. Les précurseurs immatures deviennent par la suite des ostéoclastes matures grâce notamment à RANKL, exprimé à la surface des ostéoblastes et à son récepteur, RANK, exprimé quant à lui à la surface des ostéoclastes.

1.3.2.2.1) Différenciation des monocytes en précurseurs des ostéoclastes

La différenciation des ostéoclastes débute avec l'expression du facteur de transcription PU.1. Des souris ayant subi une ablation génique pour le gène *Pu.1* sont ostéopétrotiques, puisqu'aucun ostéoclaste n'est formé. L'équilibre osseux n'est pas atteint, ce qui fait pencher la balance vers la surproduction de matrice minéralisée. Le facteur PU.1 est responsable du passage des monocytes précoces aux monocytes tardifs (Tondravi, McKercher et al. 1997).

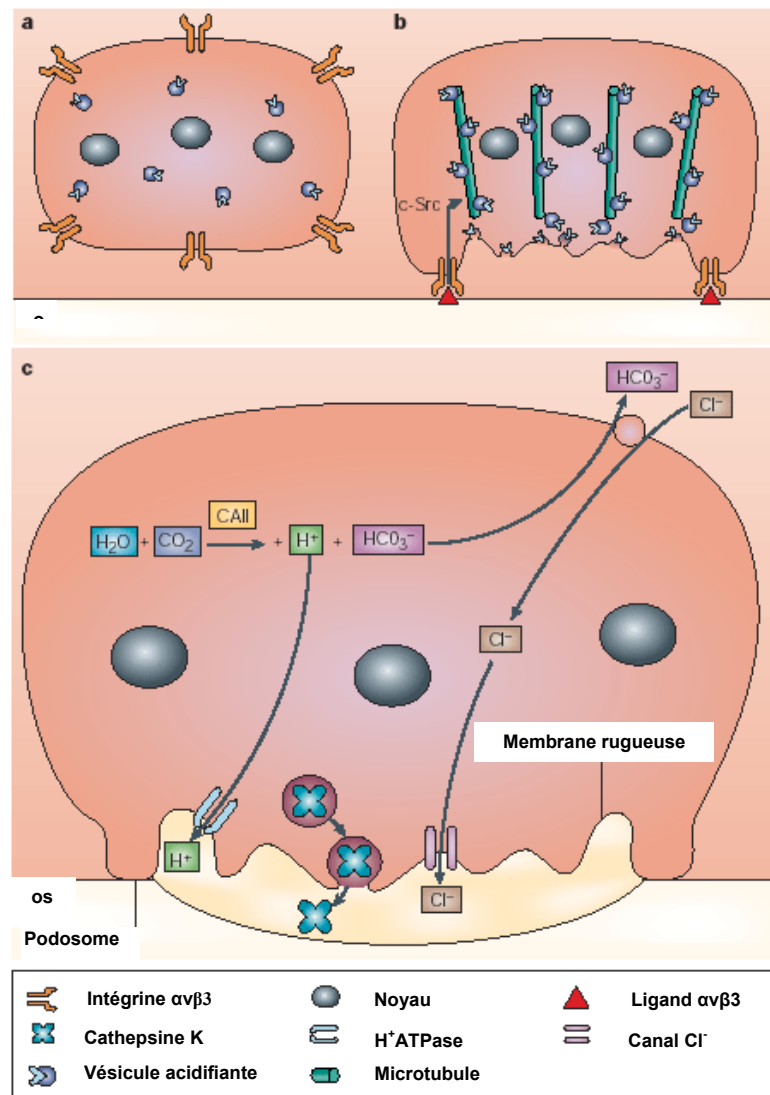


Figure 3 : Composantes des ostéoclastes (Teitelbaum and Ross 2003).

Par la suite, la famille de facteurs de transcription MITF est importante pour le passage des monocytes tardifs vers les précurseurs d'ostéoclastes. La famille MITF est composée de TFE3, TFEB, TFEC et MITF (Rehli, Lichanska et al. 1999; Luchin, Suchting et al. 2001). Des souris ayant subi une ablation génique pour le gène *Mitf* démontrent également de l'ostéopétrose. Des ostéoclastes sont produits, mais ils ne sont pas multinucléés et sont incapables de former la membrane en crête lors de la résorption (Thesingh and Scherft 1985). Les gènes cibles du facteur MITF sont importants pour la fonction des ostéoclastes comme l'anhydrase carbonique II ou bien la phosphatase acide résistante au tartatre (TRAP) (Luchin, Purdom et al. 2000). Deux molécules produites par les ostéoblastes ont également un rôle important à jouer dans la différenciation des ostéoclastes. M-CSF, produite par les ostéoblastes, se lie à son récepteur C-FMS au niveau de la membrane plasmique des monocytes. Ceci engendre une cascade de signalisation menant à l'expression de gènes responsables de la différenciation des monocytes en ostéoclastes tel que présenté à la figure 4.

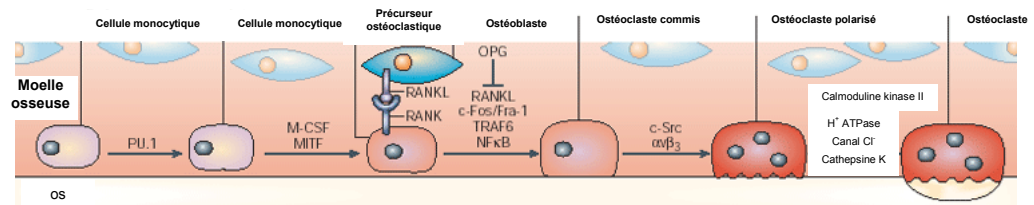


Figure 4 : Différenciation des ostéoclastes (Teitelbaum and Ross 2003).

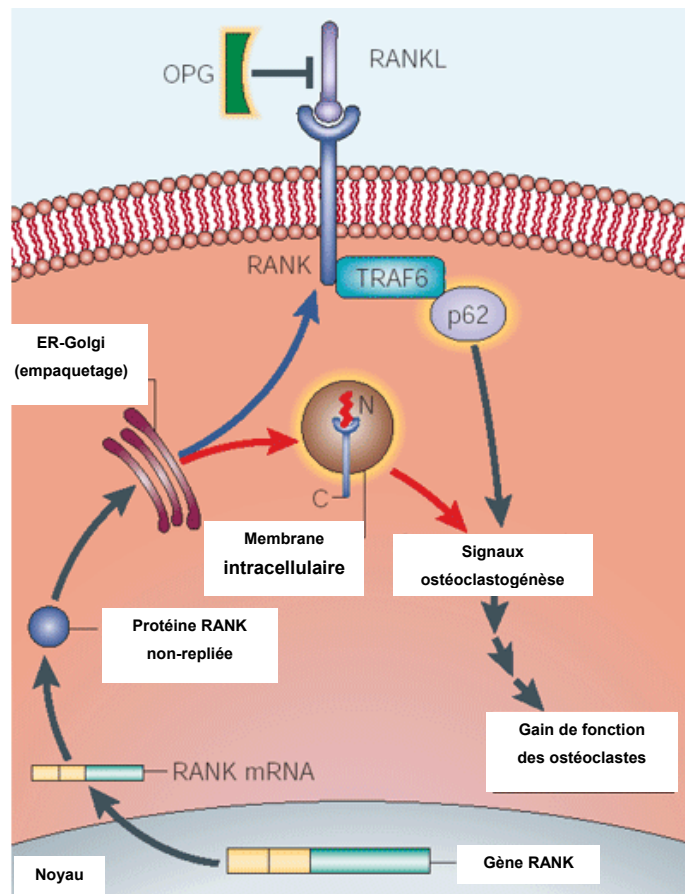
M-CSF promeut la prolifération et la survie des précurseurs d'ostéoclastes. Des souris ayant subi une ablation génique pour le gène *M-CSF* montrent d'ailleurs une absence d'ostéoclastes (Yoshida, Hayashi et al. 1990). L'autre molécule est RANK, qui sera traitée dans la section suivante.

1.3.2.2.2) Différenciation des précurseurs des ostéoclastes en oséoclastes matures

Pour la suite, les précurseurs ostéoclastiques doivent se différencier en ostéoclastes matures. Cette étape est assurée principalement par la cascade de signalisation induite par la liaison RANKL à son récepteur RANK. RANKL est un membre de la famille des « Tumor necrosis factors » (TNF) qui est exprimé à la surface des ostéoblastes ainsi que des précurseurs de la lignée ostéoblastique. RANKL interagit avec RANK qui est exprimé par les macrophages et les précurseurs ostéoclastiques. L'interaction entre RANK et son ligand active les voies des MAPK, soit la voie MAPK14, la voie JNK et la voie des ERK. Cette activation se fait à l'aide des TRAFs (TNF receptor-Associated-factors). RANK lie TRAF 1,2,3,5 et 6 (Galibert, Tometsko et al. 1998; Darnay, Ni et al. 1999). Ce sont ensuite les molécules TRAFs qui vont activer les voies MAPK. Ces voies sont importantes pour la différenciation des ostéoclastes et plusieurs régulateurs de ces voies sont impliqués comme c-FOS et FRA-1 de la famille de facteurs de transcription AP-1 (Fleischmann, Hafezi et al. 2000; Matsuo, Owens et al. 2000). Par exemple, des souris chez qui le gène *c-Fos* a été inactivé sont ostéopérotiques puisqu'elles ne possèdent pas d'ostéoclastes (Grigoriadis, Wang et al. 1994). Ceci est le même phénotype que pour des souris ayant subi une ablation génique pour le gène *Rank* ou son ligand *Rankl*, qui sont dénuées d'ostéoclastes et par conséquent ostéopérotiques (Lacey, Timms et al. 1998; Li, Sarosi et al. 2000). L'ostéoprotégérine est une molécule qui se lie à RANKL et a pour rôle d'empêcher sa liaison à RANK. Des mutations chez l'humain dans le gène de l'*OPG* causent une résorption osseuse accrue puisque l'OPG ne se lie plus à RANKL pour empêcher sa fonction sur la différenciation et l'activité des ostéoclastes (Cundy, Hegde et al. 2002; Hofbauer and Schoppet 2002; Whyte, Obrecht et al. 2002). Un des facteurs de transcription majeurs activés par la voie RANK/RANKL est le facteur de transcription NFATc1. En effet, il a été

démontré que des monocytes pouvaient se différencier en ostéoclastes même en absence de RANKL lorsque NFATc1 était surexprimé (Ishida, Hayashi et al. 2002; Takayanagi, Kim et al. 2002), ce qui démontre que NFATc1 est en aval et impliqué dans la voie de signalisation de RANKL. RANK active également une autre voie de signalisation importante, celle de NF- κ B. Des souris ayant subies une ablation génique pour le gène *Nf- κ b* sont ostéopétrotiques, causé par une absence d'ostéoclastes matures (Franzoso, Carlson et al. 1997). Ces voies de signalisation sont schématisées à la figure 5.

A



B

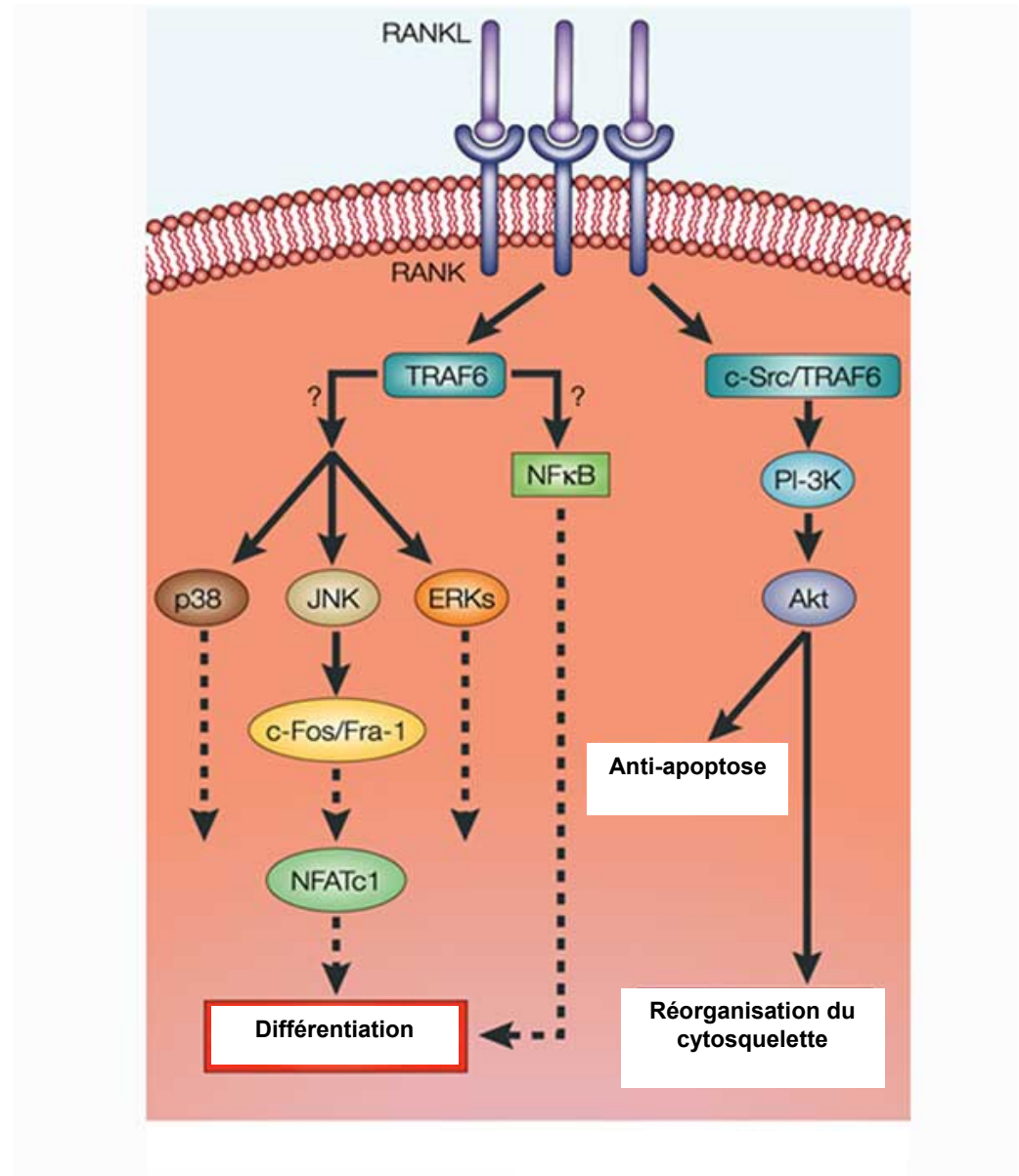


Figure 5 : Voie de signalisation RANK/RANKL (Teitelbaum and Ross 2003)

1.4) La matrice extracellulaire

La matrice extracellulaire est tout aussi importante pour les os que les cristaux d'hydroxyapatite. Ce sont ces mêmes ostéoblastes qui synthétisent la matrice extracellulaire. Celle-ci est composée de plusieurs protéines. Elle est constamment en remodelage suite au remaniement osseux. Plusieurs différents types de protéines composant la matrice extracellulaire sont synthétisés par les ostéoblastes. On peut penser au collagène, aux protéoglycans, aux glycoprotéines, aux protéines d'adhésion et aux protéines γ -carboxylées.

1.4.1) *Le collagène*

Le collagène de type I est la protéine la plus abondante (90%) au niveau de la matrice extracellulaire. Le collagène de type I est composé d'une triple hélice de deux chaînes $\alpha 1(I)$ et d'une chaîne $\alpha 2(I)$. Les chaînes α de collagène sont caractérisées de triplets Gly-X-Y répétés, où X et Y sont habituellement une proline et une hydroxyproline respectivement. En plus du collagène de type I, on peut également retrouver au sein de la matrice extracellulaire des traces de collagène de type III. Le collagène de type I sert d'échafaud, lie et oriente les autres protéines de la matrice qui servent à la déposition des cristaux d'hydroxyapatite.

1.4.2) *Les protéoglycans*

Les protéoglycans sont des macromolécules qui contiennent des chaînes de polysaccharides attachés à une protéine. Durant les premières étapes de la minéralisation, il y a production de plusieurs de ces protéoglycans dont le

versican et le hyaluronan. Par la suite, le versican est remplacé par le decorin et le biglycan. Ces derniers comportent des répétitions de motifs riches en leucine (LRR). Le decorin est impliqué dans la régulation de la fibrillation des fibres de collagène et se retrouve au niveau de la matrice extracellulaire tandis que le biglycan se retrouve plutôt associé aux ostéoblastes. L'inactivation du gène du biglycan cause une diminution de la formation de l'os, indiquant que cette protéine est importante pour la formation osseuse (Xu, Bianco et al. 1998). D'autres protéoglycans ayant un rôle au niveau de la minéralisation sont présentés dans le

Tableau I : Les principaux protéoglycans de la matrice extracellulaire osseuse.

Tableau I : Les principaux protéoglycans de la matrice extracellulaire osseuse

Protéoglycan	Fonction	Référence
Aggrecan	Organise la matrice extracellulaire, s'occupe de la rétention de l'eau et des ions	(Watanabe, Kimata et al. 1994; Wai, Ng et al. 1998)
Versican	Encore mal défini, occupe l'espace avant la minéralisation, rôle dans la différenciation	(Foster, Zeemann et al. 2005)
Decorin	Se lie au collagène et régule la formation des fibrilles, se lie au TGF- β et module son activité, inhibe l'attachement des cellules à la fibronectine	(Matheson, Larjava et al. 2005; Douglas, Heinemann et al. 2006)
Biglycan	Se lie au collagène et au TGF- β	(Mochida, Parisuthiman et al. 2006; Douglas,

Protéoglycan	Fonction	Référence
		Heinemann et al. 2007)
Asporin	Se lie au TGF- β , inhibe la chondrogénèse	(Nakajima, Kizawa et al. 2007)
Fibromodulin	Se lie au collagène et régule la formation des fibrilles, se lie au TGF- β	(Goldberg, Septier et al. 2006)
Osteoadherin	Médie l'attachement des cellules	(Lucchini, Couble et al. 2004)
Lumican	Se lie au collagène et régule la formation des fibrilles	(Matheson, Larjava et al. 2005)
Osteoglycin/Mimecan	Se lie au collagène et régule la formation des fibrilles	(Tasheva, Koester et al. 2002)
Hyaluronan	Possède la même fonction que le versican pour occuper l'espace avant la minéralisation, a un rôle dans la différenciation	(Zou, Zou et al. 2007)

1.4.3) Les glycoprotéines

La glycoprotéine la plus connue est sans contredit la phosphatase alcaline, qui a un rôle important au cours de la minéralisation. Les autres glycoprotéines retrouvées sont l'ostéonectine, la Tetranectin et la Tenascin-C.

1.4.3.1) La phosphatase alcaline

Il existe quatre formes de phosphatases alcalines soit la phosphatase alcaline non spécifique, l'intestinale, la placentaire et des cellules germinales. Celle qui est responsable de la minéralisation est la phosphatase alcaline non spécifique. C'est un marqueur de la minéralisation osseuse. La phosphatase alcaline est un dimère relié par des ponts disulfures. Elle possède une ancre glycosylphosphatidylinositol (GPI) afin de s'ancrer à la membrane plasmique. Lorsque clivé de la membrane plasmique, on peut la retrouver au niveau de la matrice extracellulaire. La phosphatase est nécessaire à la minéralisation osseuse. Son expression commence avec la minéralisation. Il a été démontré que son activité et son expression sont augmentées par la présence de β -glycérophosphate dans des cellules d'ostéosarcome humain (SaOS-2) (Orimo and Shimada 2006). Des mutations dans le gène de la phosphatase alcaline qui causent une absence de son activité sont responsables d'une maladie appelée hypophosphatasie. L'hypophosphatasie est une maladie caractéristique d'une absence de minéralisation de l'os (Weiss, Cole et al. 1988; Henthorn, Raducha et al. 1992; Orimo, Hayashi et al. 1994). Des souris dont le gène a été inactivé présentent les mêmes caractéristiques que les mutations chez les humains (Fedde, Blair et al. 1999; Anderson, Sipe et al. 2004).

1.4.3.2) Les autres glycoprotéines de la matrice extracellulaire

L'ostéonectine est la protéine la plus abondante produite par les cellules osseuses après le collagène. Elle possède des sites de liaison aux ions calcium et serait responsable de la déposition des cristaux d'hydroxyapatite. Des souris ayant subi une ablation génique pour le gène de l'ostéonectine montrent un défaut de formation osseuse (Delany, Amling et al. 2000). Cette protéine est

également exprimée dans d'autres tissus qui prolifèrent ou se remodelent de façon importante. La teranectin et la tenascin-c sont deux autres glycoprotéines retrouvées au niveau de la matrice extracellulaire, mais leur rôle n'est pas encore défini.

1.4.4) Les « siblings » et les molécules d'adhésion à motif RGD

Le terme sibling est un acronyme pour « small integrin-binding ligand, N-glycosylated proteins). Les siblings sont une famille de petites protéines pouvant lier les intégrines et qui possèdent une séquence riche en acides aminés acides. De ces protéines, on peut recenser l'ostéopontine, la BSP, DMP-1 et MEPE. Ces protéines contiennent la séquence consensus RGD (arginine, glycine et acide aspartique, respectivement) pour la liaison aux intégrines. Une de celle-ci, MEPE, sera traitée plus amplement dans une section ultérieure. Elles sont présentées dans le Tableau II : Les SIBLINGS et leurs fonctions.

Tableau II : Les SIBLINGS et leurs fonctions

Protéine	Fonction	Référence
Ostéopontine	Régule de façon négative la minéralisation, inhibe la synthèse d'oxyde nitrique, régule l'activité des ostéoclastes	(Boskey, Spevak et al. 2002; Razzouk, Brunn et al. 2002)
Bone sialoprotein	Initie la minéralisation, régulation de l'activité des ostéoclastes	(Razzouk, Brunn et al. 2002)
DMP-1	Possède un rôle dans la minéralisation et le métabolisme du phosphate	(Narayanan, Srinivas et al. 2001; Lorenz-Depiereux, Bastepe et al. 2006)
MEPE	Régule de façon négative la minéralisation	(Gowen, Petersen et al. 2003)

De façon générale, ces protéines possèdent un motif riche en acides aminés appelé ASARM pour acidic-serine-aspartate-rich associated motif. Cette région semble importante pour leurs fonctions puisque le motif ASARM de l'ostéopontine serait responsable d'inhiber la minéralisation du tract urinaire ainsi que de la formation de dépôts d'hydroxyapatite dans la salive (Long, Dindot et al. 1998; Wesson, Johnson et al. 2003). Des études *in vitro* ont démontré que l'ostéopontine est suffisante pour inhiber la formation des cristaux d'hydroxyapatite (Wada, McKee et al. 1999).

Cette hypothèse est renforcée par le fait que des souris ayant subi l'ablation du gène de l'ostéopontine montrent une plus grande quantité de minéraux comparativement à des souris sauvages (Boskey, Spevak et al. 2002). L'ostéopontine et la BSP affectent également l'activité des ostéoclastes où des formes d'ostéopontine et de BSP non-phosphorylées ne peuvent stimuler la résorption par les ostéoclastes, comparativement à des formes phosphorylées de ces mêmes deux protéines. L'ostéopontine et la BSP peuvent également lier le calcium avec une grande affinité (Razzouk, Brunn et al. 2002). DMP-1 est également impliqué dans la minéralisation puisque des cellules surexprimant DMP-1 forment plus de nodules de minéralisation comparativement à des cellules sauvages (Narayanan, Srinivas et al. 2001). Ce même groupe a également démontré que DMP-1 pouvait activer la transcription de certains gènes nécessaires à la minéralisation comme l'ostéocalcine (Narayanan, Ramachandran et al. 2003). Des souris ayant subies une ablation génique pour le gène *Dmp1* montrent des défauts dans la formation du cartilage et une diminution de la minéralisation comparativement à des souris sauvages (Ling, Rios et al. 2005; Ye, Mishina et al. 2005). Récemment, des patients ont été identifiés pour une maladie autosomale récessive d'hypophosphatémie. Ces patients montrent des mutations de *DMP1*. Les patients possédant ces mutations ont des quantités circulantes de FGF23 plus élevées que des individus normaux (Lorenz-Depiereux, Bastepe et al. 2006). Ce phénotype est également observé chez des souris *Dmp1*^{-/-} (Feng, Ward et al. 2006).

Il existe d'autres protéines contenant des motifs RGD. Celles-ci sont par exemple la fibronectine, la vitronectine, la fibrilline et la thrombospondine. Celles-ci sont présentées dans le

Tableau III : Les autres protéines à motif RGD de la matrice extracellulaire osseuse.

Tableau III : Les autres protéines à motif RGD de la matrice extracellulaire osseuse

Protéine	Fonction	référence
fibronectine	Possède un rôle dans l'adhésion des cellules à la matrice extracellulaire, lie l'héparine, la gélatine et le collagène	(Grzesik and Robey 1994)
vitronectine	Possède un rôle dans l'adhésion des cellules à la matrice extracellulaire, lie le collagène et l'héparine	(Schvartz, Seger et al. 1999)
fibrilline 1 et 2	Régule la formation de fibres élastiques	(Hubmacher, Tiedemann et al. 2006)
thrombospondine 1 à 4	Possède un rôle dans l'adhésion des cellules, lie l'héparine, le collagène, la thrombine, les facteurs des plaquettes et la laminine.	(Bornstein, Agah et al. 2004)

1.4.5) Les protéines γ -carboxylées

Il existe trois protéines γ -carboxylées, la matrix gla protein (MGP), l'ostéocalcine et la protéine S. Ces protéines sont modifiées de façon post-traductionnelle à l'aide de la γ -carboxylase, qui est dépendante de la vitamine K. Ce sont les acides glutamiques qui sont modifiés en acide gamma-carboxy-glutamiques. La vitamine K sert de cofacteur à la réaction. La production de résidus γ -carboxylés augmente l'affinité de ces protéines pour le calcium et donc, les cristaux d'hydroxyapatite. Il sera question ici majoritairement de l'ostéocalcine.

1.4.5.1) L'ostéocalcine

L'ostéocalcine est une protéine exprimée exclusivement au niveau du tissu osseux, plus principalement au niveau des ostéoblastes et des ostéocytes. Les souris ne possédant pas le gène de l'ostéocalcine montrent une densité osseuse accrue (Ducy, Desbois et al. 1996). La mesure de l'ostéocalcine dans le sérum est un bon indicateur du remodelage osseux. L'ostéocalcine est donc un marqueur de choix dans l'évaluation de l'activité des ostéoblastes. Cette protéine est petite, avec une masse moléculaire de 5,8 kDa pour ses 49 acides aminés. La sécrétion d'ostéocalcine est dépendante de la $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, qui augmente son expression. L'ostéocalcine a été montré comme pouvant lier l'hydroxyapatite (Hauschka, p.v. 1989, lian, j, stewart, c 1989).

1.4.5.1) L'ostéocalcine et le métabolisme énergétique

Des données émergent quant au métabolisme énergétique comme étant relié à la minéralisation et la densité osseuse. Des souris ayant été inactivées pour la *Leptine* montrent une densité osseuse accrue consécutive d'une diminution du catabolisme osseux par les ostéoclastes (Ducy, Karsenty 2000). Ces souris sont également obèses. Un autre modèle de souris ne possédant pas d'adipocytes montre le même phénotype osseux. Ces souris ne sécrètent évidemment pas de leptine. Ceci est d'une importance capitale puisque cela prouve que ce n'est pas le fait qu'elles soient obèses qui crée le phénotype osseux, mais bien l'absence de leptine. Pour agir, la leptine doit être présente au système nerveux central puisque des souris ayant été inactivées pour le récepteur de la leptine spécifiquement au niveau des ostéoblastes ne montrent pas de défauts osseux tandis que son inactivation au niveau des neurones imite le phénotype des souris déficientes pour la leptine (Shi, Yadav, Karsenty,

2008). Une autre expérience de parabiose a montré que c'est le contrôle neuronal qui est responsable du phénotype osseux et non la leptine présente dans la circulation (Takeda, Elefteriou, karsenty, 2002). De plus, cette étude a utilisé différentes drogues pour illustrer ce concept. L'isoprotérénol, un sympathicomimétique, a corrigé le phénotype de haute densité osseuse dans les souris ayant été inactivées pour le gène codant pour la leptine tandis que le propranolol, un bloqueur des récepteurs β -adrénergiques induit une augmentation de la densité osseuse (Takeda, elefteriou, karsenty, 2002). Le système nerveux sympathique est donc un régulateur important de la masse osseuse. L'utilisation de ces deux drogues a montré que l'isoprotérénol pouvait induire la différenciation des ostéoclastes due à l'expression accrue de RankL (Elefteriou, Karsenty, 2005).

Des données récentes montrent également un autre rôle potentiel à l'ostéocalcine. En effet, elle pourrait servir comme régulateur de l'homéostasie. Le groupe de Karsenty a accumulé des données sur le fait que l'os et le métabolisme énergétique pourraient être reliés. L'ostéoclastine aurait un rôle important à jouer dans ce mécanisme. Par exemple, en ce qui a trait à l'ostéocalcine, il a été montré que l'ostéocalcine pouvait réguler la prolifération des cellules β et augmenter la production d'insuline in vivo et donc diminuer les taux de glucose circulants (Lee, Ferron, Karsenty, 2007, Ferron, m. 2008). Ils ont de plus montré que cette augmentation de l'expression de l'insuline passait par l'expression de l'adiponectine, une protéine ayant été montrée comme pouvant augmenter la sensibilité à l'insuline (Otabe, Yuan Yamada, 2007). Un modèle où des souris ont été rendues obèses par l'injection de streptozotocine montre que des souris mimant un gain de fonction de l'ostéocalcine sont protégées et sont moins obèses que les souris sauvages (Lee, Ferron, karsenty, 2007, Ferron, m. 2008). Finalement, une autre étude a montré que la sécrétion d'insuline est due en partie à l'ostéocalcine puisque des souris ayant été

inactivées pour le gène codant pour l'ostéocalcine restaure les taux d'insuline dans des souris déficientes pour la leptine Hinoi, karsenty, 2008). La leptine augmenterait l'expression du gène *Esp*, qui aurait ensuite pour rôle d'inhiber l'expression de l'ostéocalcine. L'expression du gène *Esp* serait quant à elle due au facteur de transcription Activator of Transcription 4 (ATF4) (Hinoi, Karsenty, 2009). ATF4 serait également important lui-même dans l'inhibition de la sécrétion de l'insuline et de la résistance à l'insuline puisque des souris ayant été inactivées pour le gène *Atf4* dans les ostéoblastes seulement montrent ce phénotype, le même que pour les souris *Atf*^{-/-} (Yoshizawa, karsenty, 2009). Ces données montrent que l'ostéocalcine pourrait agir comme une hormone sur le métabolisme énergétique passant par le système nerveux central.

1.4.5.2) Les autres protéines γ -carboxylées

La protéine MGP est retrouvée dans plusieurs tissus et des souris ayant subi une ablation génique du gène *Mgp* montrent une calcification de l'aorte, ce qui démontre que cette protéine a notamment pour rôle de prévenir la minéralisation dans les tissus qui ne doivent pas minéraliser (Luo, Ducy et al. 1997). On observe chez ces souris une augmentation de l'expression de Runx-2 et de l'ostéopontine, un facteur important pour la différenciation des précurseurs des ostéoblastes en ostéoblastes et une protéine importante dans la minéralisation, respectivement (Steitz, Speer et al. 2001). La capacité de garder les cellules de la vasculature comme étant des cellules contractiles réside dans le fait que MGP sous sa forme gamma-carboxylée peut lier BMP-2 en bloquant les capacités ostéoinductives des BMP-2 (Bostrom, Tsao et al. 2001; Zebboudj, Imura et al. 2002). Lorsque cette protéine, est réintroduite, la calcification des vaisseaux sanguins est empêchée (Murshed, Schinke et al. 2004). La fonction

exacte de MGP n'est pas encore parfaitement connue, mais on peut avancer qu'elle peut lier le calcium et par conséquent les cristaux d'hydroxyapatite, empêchant leur croissance. De plus, MGP aurait pour rôle d'empêcher la transformation des cellules de la vasculature en cellules ressemblant à des ostéoblastes, pouvant former des cristaux d'hydroxyapatite et une matrice extracellulaire de façon sommaire (Roy and Nishimoto 2002; Zebboudj, Shin et al. 2003). En ce qui a trait à la protéine S, son rôle principal est au niveau de la coagulation des plaquettes sanguines (Stenflo 1999). Une autre protéine gamma-carboxylée est GAS6. Cette protéine aurait un rôle à jouer dans la prévention de la calcification de la vasculature. Elle agirait donc sensiblement de la même façon que MGP (Son, Kozaki et al. 2006; Son, Kozaki et al. 2007). Ce groupe a découvert que cette protéine a un rôle de prévention de la calcification lorsqu'administré de façon dose-dépendante et que le phosphate peut inhiber son activité. UCMA est une autre protéine gamma-carboxylée qui semblerait importante pour la minéralisation. En effet, une étude a montré qu'Ucma aurait un rôle négatif sur la différenciation des ostéoblastes, mais non des chondrocytes. De plus, l'expression d'Ucma serait inhibée par BMP-2 (Surmann-Schmitt, Dietz et al. 2008). La périostine est une autre protéine gamma-carboxylée impliquée au niveau de la minéralisation. Elle semble impliquée dans la minéralisation via la sclérostine au niveau des ostéocytes. En effet, un groupe a découvert que la périostine peut inhiber Sost, ce qui cause une augmentation de la masse osseuse. Ils ont montré ceci en utilisant un anticorps bloquant la sclérostine, ce qui a compensé la diminution de la densité osseuse chez des souris ayant été inactivées pour le gène de la périostine (Bonnet, Standley et al. 2009)

1.5) La minéralisation

La partie dure, le minéral de l'os se nomme l'hydroxyapatite. Il est composé de calcium et de phosphate $[\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2]$. Il représente environ 50 à 70% du poids des os chez les mammifères adultes, la matrice extracellulaire organique comptant pour 20 à 40%, l'eau de 5 à 10% et les lipides pour moins de 3%. Les cristaux d'hydroxyapatite sont très petits, soit environ 2 pm. L'os comporte de nombreuses impuretés, retrouvées sous forme d'ions carbonates et de magnésium. Les cristaux d'hydroxyapatite se déposent sur la matrice extracellulaire entre les fibrilles de collagène. Pour que la minéralisation ait lieu, deux éléments doivent être présents. Premièrement, une matrice de collagène pour accepter les dépôts d'hydroxyapatite et deuxièmement, la présence de la phosphatase alcaline pour cliver le pyrophosphate inorganique. Donc, la présence d'une matrice extracellulaire et l'absence de pyrophosphate inorganique sont suffisantes pour induire la minéralisation ectopique (Murshed, Harmey et al. 2005).

1.5.1) Déposition des cristaux d'hydroxyapatite

L'initiation de la minéralisation se fait à l'aide de vésicules de calcification (Boskey, Boyan et al. 1997). Ces vésicules émergent de la membrane plasmique et permettent d'emprisonner les ions calcium et phosphate dans un environnement propice à la minéralisation. Les cristaux se forment lorsque les ions sont en quantité suffisante pour que la nucléation puisse se produire. Par la suite, les cristaux s'apposent les uns aux autres et des groupes de cristaux peuvent se joindre l'un à l'autre. Une fois que les cristaux en formation deviennent assez gros, ils percent la membrane de la vésicule de

calcification et se déposent sur la matrice extracellulaire, entre les fibres de collagène.

1.5.1.1) Les vésicules de calcification

Les vésicules de calcification sont donc très importantes pour la minéralisation. Qu'en est-il exactement de la nature de ces vésicules? Elles font environ 100 nm de diamètre et sont générées par le bourgeonnement des chondrocytes, ostéoblastes et odontoblastes. Plusieurs protéines ont été montrées comme faisant partie et intégrées de façon spécifique dans des vésicules de calcification. C'est au niveau des vésicules de calcification que les cristaux sont d'abord formés. Premièrement, le calcium est attiré dans l'environnement des vésicules de calcification par plusieurs molécules liant le calcium présentes au sein des vésicules de calcification comme par exemple l'annexine-II, l'annexine-V, l'annexine-VI et la calbindine. Le phosphate est fourni par l'action de la phosphatase alcaline et transporté dans les vésicules de calcification par des transporteurs de phosphate présents au niveau des vésicules (Montessuit, Caverzasio et al. 1991). Cet environnement favorable rend plus facile la formation des cristaux d'hydroxyapatite à l'intérieur des vésicules de calcification. Il y a également des anhydrases carboniques qui sont spécifiquement incorporées dans les vésicules de calcification afin d'augmenter le pH à l'intérieur pour le rendre plus favorable à la formation initiale de cristaux (Steckschulte, Morris et al. 1992). Des phospholipases et des protéases présentes à la surface des vésicules digèrent en partie la membrane de la vésicule, ce qui permet au cristal, lors de la deuxième phase, de percer la membrane de la vésicule de calcification plus aisément (Wuthier 1973; Hirschman, Deutsch et al. 1983). Le collagène de type II et X permettent

également de faire un pont entre les vésicules de calcification et les cristaux d'hydroxyapatite où ces mêmes vésicules et cristaux d'hydroxyapatite peuvent se déposer sur ces fibres de collagène (Wu, Genge et al. 1991). Récemment, un groupe de recherche a analysé le contenu des vésicules de calcification à l'aide d'une approche protéomique et a recensé plusieurs protéines étant incorporées de façon spécifique dans ces vésicules de calcification (Xiao, Camalier et al. 2007). On y retrouve beaucoup de protéines membranaires et de protéines de la matrice extracellulaire. L'environnement des vésicules de calcification contient des enzymes responsables de la dégradation d'éléments inorganiques empêchant la nucléation des cristaux d'hydroxyapatite comme le pyrophosphate inorganique (PPi). La phosphatase alcaline est l'enzyme qui remplit ce rôle au niveau des vésicules de calcification (Hessle, Johnson et al. 2002). C'est une autre enzyme, l'ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase 1 (ENPP1) qui a pour rôle de générer le pyrophosphate inorganique à partir de nucléotides. La production du pyrophosphate inorganique est donc essentielle pour la génération du phosphate entrant dans la composition de l'hydroxyapatite. Plusieurs facteurs stimulent la production de pyrophosphate inorganique comme le TGF- β (Rosenthal, Cheung et al. 1991), l'ascorbate, l'acide rétinolique et l'hormone thyroïdienne (Ryan, Kurup et al. 1991; Rosenthal and Henry 1996; Rosenthal and Henry 1999) tandis que l'interleukine 1 β , le TNF- α , le PTHrP et l'IGF-1 (Terkeltaub 2001) diminuent la genèse de ce même pyrophosphate inorganique. Il doit exister un équilibre entre les quantités de phosphate et de pyrophosphate inorganique pour assurer la minéralisation. À de faibles concentrations, le pyrophosphate favorise la minéralisation tandis qu'il inhibe la minéralisation à de fortes concentrations en formant des cristaux de calcium pyrophosphate dihydrate (CPPD), qui pourraient alors inhiber l'activité de la phosphatase alcaline (Garimella, Bi et al. 2006) et ainsi nuire à cet équilibre.

1.5.1.1.1) ENPP1

ENPP1 est une protéine importante exprimée dans les vésicules de calcification. Elle est exprimée de façon spécifique dans celles-ci par rapport à la surface cellulaire (Johnson, Moffa et al. 1999). Des études de localisation ont démontré qu'un motif di-leucine situé à l'extrémité N-terminale d'ENPP1 causait un enrichissement de cette dernière aux sites de formation des vésicules de calcification (Vaingankar, Fitzpatrick et al. 2004). Une section sera consacrée aux motifs de localisation cellulaire. L'expression d'ENPP1 ainsi que son activité sont régulées à la hausse par la $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ et par le TGF- β dans des cellules en minéralisation de la lignée MC3T3 qui sont des ostéoblastes murins (Johnson, Moffa et al. 1999). Une mutation naturelle dans le gène d'*Enpp1*, un changement de la glycine 568 pour un codon stop, cause un phénotype appelé « tiptoe walking mice ». Ces souris présentent une calcification des ligaments et du cartilage, qui fait qu'on a l'impression de voir la souris marcher sur la pointe de ses pattes (Okawa, Nakamura et al. 1998). Cette mutation fait en sorte que la quantité de pyrophosphate est diminuée dans l'environnement de ces tissus et c'est cette diminution de pyrophosphate qui cause cette calcification des ligaments et du cartilage. Des patients humains possédant des mutations dans le gène de *ENPP1* ainsi que des souris ayant subi une ablation génique pour le gène de *Enpp1* présentent le même phénotype (Rutsch, Vaingankar et al. 2001; Hessle, Johnson et al. 2002).

1.5.1.1.2) Phosphatase alcaline

Le pyrophosphate inorganique est utilisé par la phosphatase alcaline afin de générer des ions phosphates entrant dans les cristaux d'hydroxyapatite. Des mutations dans le gène de la phosphatase alcaline causent l'hypophosphatasie. Cette maladie est caractérisée par une accumulation de pyrophosphate inorganique, ce qui inhibe la minéralisation (Whyte 1994). Des souris ayant

subi une ablation génique pour gène de la phosphatase alcaline présentent le même phénotype (Fedde, Blair et al. 1999). Une étude utilisant ces mêmes souris a démontré que les cristaux initiaux sont bien formés dans les vésicules de calcification, mais que la croissance de ces cristaux initiaux est empêchée par le pyrophosphate inorganique (Anderson, Sipe et al. 2004). De plus, ces souris montrent une augmentation des niveaux d'ostéopontine, un inhibiteur de la minéralisation (Harmey, Hessle et al. 2004). De façon intéressante, une restauration du phénotype normal tant pour les paramètres de minéralisation que pour l'expression de l'ostéopontine ou des niveaux de pyrophosphate inorganique est observée chez des souris hypophosphatasiques où le gène *ENPP1* a été inactivé (Hessle, Johnson et al. 2002; Harmey, Hessle et al. 2004).

1.5.1.1.3) ANK

Une autre protéine importante pour la formation des cristaux d'hydroxyapatite est la protéine ANK. ANK est un transporteur de pyrophosphate qui a pour rôle de transporter le pyrophosphate à l'extérieur de la cellule (Ho, Johnson et al. 2000). Des mutations dans le gène *ANK* produisent une calcification importante des tissus péri-articulaires et des ligaments (Ho, Johnson et al. 2000). Ces mutations font en sorte que la quantité de pyrophosphate est diminuée dans l'environnement de ces tissus ce qui cause leur calcification. Une étude a démontré que les souris nulles pour le gène de *Ank* ou de *Enpp1* possèdent des concentrations moins élevées d'ostéopontine, un inhibiteur de la minéralisation (Johnson, Goding et al. 2003). Tout comme pour les souris dont les gènes codant pour les protéines de la phosphatase alcaline et pour *ENPP1* ont été inactivés (Hessle, Johnson et al. 2002), les souris dont les gènes codant pour la phosphatase alcaline et *Ank* sont inactivés montrent un phénotype identique à des souris saines (Harmey, Hessle et al. 2004).

1.5.2) Modèle de la minéralisation par les vésicules de calcification

Un modèle dans lequel l'intégration des concepts précédents peut être établie est présenté à la figure 6. Le PPi est généré par la protéine NPP1 (ENPP1), tant à la surface des ostéoblastes qu'au niveau des vésicules de calcification. Le PPi est également transporté par la protéine ANK vers l'extérieur de la cellule. Il est par la suite transformé en phosphate par la phosphatase alcaline (TNAP). Tout comme pour NPP1, la phosphatase alcaline peut générer le Pi tant à partir de la membrane plasmique qu'au niveau des vésicules de calcification. Le PPi inhibe la minéralisation, en empêchant la formation des cristaux d'hydroxyapatite, tout comme l'ostéopontine (OPN). De plus, le PPi inhibe également l'expression de ENPP1 et de ANK tout en augmentant l'expression de l'OPN.

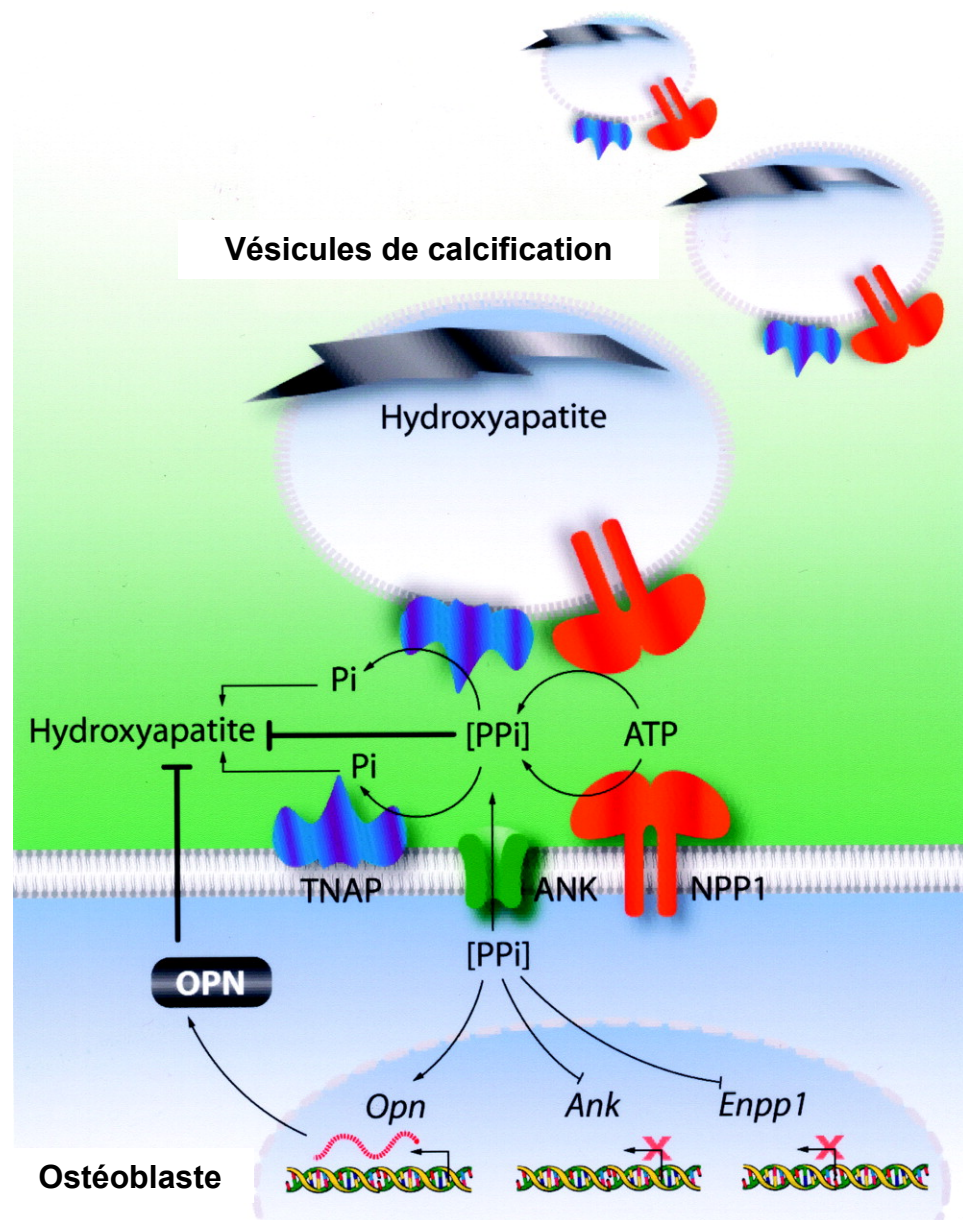


Figure 6 : Modèle de la minéralisation osseuse impliquant les vésicules d'hydroxyapatite (Harmey, Hessle et al. 2004).

2) Le métabolisme du phosphate et les désordres cliniques reliés au phosphate

Le phosphate inorganique (Pi), en plus d'être un élément vital pour la fonction de la cellule, est également un élément essentiel dans la composition des cristaux d'hydroxyapatite. Le phosphate inorganique entre dans la composition de l'ADN, de l'ARN, des protéines, des phospholipides membranaires et participe à une multitude d'événements cellulaires comme par exemple la synthèse de l'ATP. Au niveau de l'os, des perturbations des concentrations de phosphate circulantes amènent des anomalies morphologiques importantes. Dans un passé pas si lointain, les problèmes cliniques de minéralisation osseuse étaient reliés au calcium. Avec le temps sont apparus des désordres dépendants du phosphate, l'autre élément majeur de la composition du minéral de l'os. L'hypophosphatémie peut donc entraîner des désordres comme le rachitisme et l'ostéomalacie. D'un autre côté, des concentrations circulantes trop élevées en phosphate amènent des défaillances rénales et induisent de l'hyperparathyroïdisme secondaire.

2.1) Le métabolisme du phosphate

Le contenu plasmatique de phosphate est un équilibre entre son absorption intestinale et son excrétion rénale. Le phosphate est présent dans les aliments et généralement en quantité suffisante pour la fonction de l'organisme. L'ingestion de phosphate chez un individu normal varie de 0,8 à 1,5 gramme par jour. Une fois absorbé, le phosphate inorganique s'équilibre entre la circulation sanguine et l'os. Environ 85-90% du phosphate de l'organisme se trouve au niveau de l'os sous forme de cristaux d'hydroxyapatite. Si

l'organisme subit des carences dans l'absorption de phosphate, le minéral osseux est l'unique source de phosphate pour les activités de la cellule. Il y aura donc une résorption plus importante de l'os par les ostéoclastes que la formation d'os par les ostéoblastes. Même si nous avons besoin d'une bonne quantité de phosphate inorganique lors de la croissance, il est intéressant de noter que la majorité du phosphate absorbé se retrouve excrété dans l'urine.

2.1.1) L'absorption intestinale de phosphate

Le phosphate inorganique est présent dans la circulation sanguine à une concentration d'environ 4 mg/dl. La majeure portion du phosphate est absorbée par le petit intestin. La vitamine D sous sa forme active, la $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, stimule l'absorption de phosphate et de calcium tout en inhibant leur excrétion. Le PTH a le même effet sur ces 2 ions via la conversion de la forme inactive en forme active de la vitamine D. Le PTH augmente l'expression des enzymes responsables de l'ajout des groupements hydroxyls sur la vitamine D, soit les α -1 et α -25 hydroxylases. L'absorption du phosphate par l'intestin est effectuée de façon passive avec un K_m relativement bas d'environ 2mM.

2.1.2) La réabsorption rénale du phosphate

C'est au niveau du rein et plus particulièrement au niveau des tubules proximaux rénaux que le phosphate est réabsorbé et où la majorité des mécanismes de contrôle sont présents. La sécrétion du phosphate est déterminée par le taux de filtration glomérulaire. Plus le taux de filtration glomérulaire est élevé, plus la réabsorption sera importante. Cependant, il existe un point

maximum à partir duquel une augmentation du taux de filtration glomérulaire n'entraînera pas une augmentation de la réabsorption du phosphate, ce qui résultera en une perte de phosphate dans l'urine. La majorité du phosphate (60 à 80%) est réabsorbé au niveau du tubule proximal convolué. Le tubule proximal droit réabsorbe de 15 à 20% du phosphate et moins de 10% est réabsorbé dans les parties plus distales du néphron (Tenenhouse 2005). Le transport intracellulaire des ions phosphate est unidirectionnel. Il est réabsorbé au niveau de la membrane en brosse du côté apical des cellules des tubules rénaux, transporté de l'autre côté de la cellule où il est excrété du côté basolatéral. La capture du phosphate se fait par des transporteurs dépendants du sodium, les transporteurs NaPi (Werner, Moore et al. 1991). Afin de conserver le gradient de sodium entre l'extérieur et l'intérieur de la cellule, cette capture est également dépendante de pompes Na^+/K^+ ATPases. La régulation de la réabsorption du phosphate se fait principalement par un transport accru de la protéine vers la membrane apicale des cellules rénales (Levi, Lotscher et al. 1994; Lotscher, Kaissling et al. 1997; Pfister, Hilfiker et al. 1998) ou inversement par un transport vers les lysosomes lorsque l'organisme répond à une augmentation du PTH circulant où lorsqu'il y a un apport accru de phosphate dans la diète (Pfister, Lederer et al. 1997; Keusch, Traebert et al. 1998).

2.1.2.1) Mécanismes moléculaires du transport du phosphate.

Quelques cotransporteurs NaPi ont été identifiés chez les mammifères, soit les transporteurs de la famille NaPi de type I, de type II et de type III. Les membres de la famille I et II sont présents au niveau de la membrane des cellules du tubule proximal. La majorité du phosphate est réabsorbé par le NaPi

IIa, le cotransporteur NaPi de type I étant également perméable à d'autres ions comme le chlore par exemple (Busch, Schuster et al. 1996). D'autres cotransporteurs de phosphate, ceux de type III ont été démontrés aptes à transporter le phosphate dans d'autres tissus que le rein, tout en étant également présents dans cet organe mais en quantités minimales comparativement aux autres types de transporteurs (Kavanaugh, Miller et al. 1994; Collins, Bai et al. 2004). Ces cotransporteurs s'accaparent du phosphate sous forme d'ions monovalents H_2PO_4^- ou divalents HPO_4^{2-} .

2.1.2.1.1) Le cotransporteur NaPi de type I

Le cotransporteur NaPi de type I est présent dans tous les segments des tubules rénaux (Biber, Custer et al. 1993; Custer, Meier et al. 1993; Custer, Lotscher et al. 1994; Tenenhouse, Roy et al. 1998). Le NaPi I possède un champ d'action plus vaste que le cotransporteur de type II (Busch, Schuster et al. 1996). Le cotransporteur NaPi de type I n'est pas régulé par des concentrations variables des niveaux de phosphate circulant, contrairement au cotransporteur de type II (Verri, Markovich et al. 1995).

2.1.2.1.2) Le cotransporteur NaPi de type II

Il existe trois types de cotransporteurs de type II, le IIa, le IIb et le IIc. Le cotransporteur NaPi de type IIa est une protéine membranaire comprenant plusieurs domaines effectuant des tâches diverses. La stœchiométrie d'ions sodium : phosphate est de 3 : 1 (Forster, Loo et al. 1999). Plusieurs mécanismes sont responsables de la régulation de l'expression du cotransporteur NaPi IIa. Premièrement, une carence dans l'absorption de phosphate augmente l'abondance du cotransporteur à la membrane, sans pour autant augmenter l'abondance de son ARNm (Pfister, Hilfiker et al. 1998). À l'inverse, une exposition à des quantités importantes de phosphate mène à l'internalisation du

cotransporteur au niveau des endosomes où il sera ensuite dégradé. D'autres facteurs peuvent faire varier la quantité du cotransporteur NaPi IIa comme par exemple FGF23 et sFRP-4. Ces deux protéines seront abordées dans des sections ultérieures. Des souris ayant subies une ablation génique du gène NaPi IIa démontrent une augmentation importante de l'excrétion urinaire de phosphate, de l'hypophosphatémie et une diminution de l'expression du cotransport NaPi au niveau de la membrane de bordure en brosse des cellules rénales (Beck, Karaplis et al. 1998). Le cotransporteur NaPi IIa est également exprimé au niveau des ostéoclastes, mais pas au niveau des ostéoblastes (Gupta, Tenenhouse et al. 2001; Khadeer, Tang et al. 2003).

L'internalisation du transporteur dépend de l'activation de la voie de la protéine kinase C (PKC) par la liaison du PTH à son récepteur au niveau de la membrane apicale (Traebert, Roth et al. 2000; Traebert, Volkl et al. 2000). L'activation préférentielle de la voie de la PKC à la membrane apicale est due à la présence spécifique des protéines NHERF (Mahon, Donowitz et al. 2002). Au niveau de la membrane basolatérale, c'est la voie de la protéine kinase A (PKA) qui est activée lors de la liaison du PTH à son récepteur. L'activation de la voie de la PKA ne mènera pas uniquement à une internalisation du cotransporteur NaPi IIa mais aussi à une diminution de son expression (Honegger, Capuano et al. 2006).

Le cotransporteur NaPi de type IIc possède une grande homologie au cotransporteur NaPi IIa. La différence principale réside dans le fait que sa stœchiométrie sodium : phosphate est de 2 : 1 (Bacconi, Virkki et al. 2005). Il participe aussi au transport du phosphate mais à un degré moindre que le cotransporteur NaPi IIa. Récemment, des études ont démontré que ce transporteur est le gène muté dans HHRH, le rachitisme hypophosphatémique héréditaire autosomique avec hypercalciurie, une maladie liée à l'homéostasie

du phosphate. Celle-ci sera discutée plus amplement dans une section ultérieure. Finalement, le transporteur NaPi IIb est exprimé dans une multitude de tissus, dont les intestins (Hilfiker, Hattenhauer et al. 1998; Radanovic, Wagner et al. 2005) et les ostéoblastes (Lundquist, Murer et al. 2007).

2.1.2.1.3) Le cotransporteur NaPi de type III

Les cotransporteurs NaPi de type III sont exprimés dans la plupart des tissus (Kavanaugh, Miller et al. 1994). Ils ont tout d'abord été identifiés comme des récepteurs pour les rétrovirus puisqu'ils permettent l'entrée de certains virus. Ils ont tout d'abord été nommés Glvr-1 pour « gibbon ape leukemia virus » et Ram-1 pour « amphotropic murine retrovirus ». Ils ont été par la suite renommés PIT-1 et PIT-2, respectivement (Kavanaugh and Kabat 1996). Ils auraient un rôle de transport de phosphate couplé au sodium dans une grande variété de tissus. Ceux-ci sont exprimés de façon à couvrir la plupart des tissus qui ne se recoupent de façon générale (Tatsumi, Segawa et al. 1998; Uckert, Willmsky et al. 1998). Cependant, des études récentes semblent associer l'expression des cotransporteurs PIT-1 et PIT-2 au transport de phosphate dans les ostéoblastes et contribuer à la minéralisation osseuse (Zoidis, Ghirlanda-Keller et al. 2004; Suzuki, Ghayor et al. 2006; Yoshiko, Candelieri et al. 2007). Il existe également au niveau de ces mêmes ostéoblastes plusieurs molécules comme le PDGF, l'IGF-1, l'épinéphrine et le bFGF capables de réguler la quantité de ces cotransporteurs et donc de réguler via leur expression la quantité de phosphate au niveau des ostéoblastes (Suzuki, Palmer et al. 2000; Suzuki, Palmer et al. 2001; Zoidis, Ghirlanda-Keller et al. 2004).

2.2) La vitamine D et le PTH comme réseau du métabolisme du phosphate.

La vitamine D occupe une place cruciale dans le métabolisme. Ici seront résumés des concepts importants de l'axe de la vitamine D et du PTH dans le métabolisme du phosphate. Un des rôles principaux de la vitamine D est de maintenir l'équilibre homéostasique du calcium et de façon plus indirecte, du phosphate (Jones, Strugnell et al. 1998). Il est important que cet axe requiert la présence de ces deux composantes pour que cette mobilisation ait lieu (Garabedian, Holick et al. 1972; Garabedian, Tanaka et al. 1974). C'est la glande parathyroïde qui est responsable de réseau. Premièrement, les protéines senseur de calcium peuvent capter les changements dans les concentrations circulantes de calcium. Ces protéines couplées à des protéines G vont causer une augmentation de l'expression du PTH. Ce PTH peut alors agir sur les ostéoblastes ainsi qu'au niveau des tubules rénaux proximaux pour augmenter la mobilisation du calcium et du phosphate provenant de l'os et la réabsorption du calcium et du phosphate, respectivement. Dans les tubules rénaux, il y a une augmentation de l'enzyme 1- α hydroxylase, ce qui permet l'activation de la vitamine D (Brenza and DeLuca 2000).

2.2.1) Actions de la vitamine D.

La vitamine D se lie aux récepteurs de la vitamine D (VDR). Ce récepteur est un membre de la classe II des hormones stéroïdiennes. Comme les autres récepteurs, il possède un domaine de liaison à l'ADN le domaine-C, un domaine de liaison au ligand, le domaine-E et un domaine d'activation, le domaine-F (Jones, Strugnell et al. 1998). Ce récepteur se lie aux éléments de réponse à la vitamine D. Un des gènes régulés de façon la plus importante, est le 24- α hydroxylase, qui a pour rôle de dégrader la vitamine D active, agissant

alors comme une boucle de rétroaction négative. Le récepteur à la vitamine D forme un hétérodimère avec le récepteur à l'acide rétinoïque où quelques coactivateurs peuvent lier cet hétérodimère comme par exemple SARC1, 2 et 3, ainsi que DRIP205 (Rachez, Suldan et al. 1998). Des études ont montré que la vitamine D a un effet positif sur la densité et la croissance osseuse. Par exemple, une association positive entre la densité osseuse et la force de l'os par rapport aux quantités circulantes de vitamine D a été observée (Ziegler, Scheidt-Nave et al. 1995; Nakamura, Nashimoto et al. 2001). Un autre paramètre pouvant être mesuré montrant l'effet de la vitamine D sur la formation osseuse est la propension aux fractures. Des études ont montré une diminution des taux de fractures chez des patients recevant un supplément quotidien de vitamine D (Feskanich, Willett et al. 2003; Trivedi, Doll et al. 2003). Finalement, une corrélation inverse est obtenue entre des marqueurs de remaniement osseux comme la PTH et phosphatase alcaline avec les quantités circulantes de vitamine D (Jesudason, Need et al. 2002). Bien que les souris ayant subi une ablation génique pour le *Pth* ou la *1 α -hydroxylase* possèdent une légère hypocalcémie, les animaux ayant subi la double ablation génique meurent de tétanie hypocalcémique à trois semaines (Panda, Miao et al. 2001; Xue, Karaplis et al. 2005). Cette étude montre également à la fois des rôles synergistiques et différents sur la croissance osseuse. En effet, le PTH aurait une action positive sur la minéralisation par apposition tandis que la vitamine D aurait plutôt une action positive sur la minéralisation endochondrale. En ce qui a trait au rôle synergistique, on peut noter qu'elles affectent tous les deux de façon coopérative le transport du calcium (Panda, Miao et al. 2001; Xue, Karaplis et al. 2005).

2.2.2) Rôle de la vitamine D sur d'autres types cellulaires.

Il a été montré que la vitamine D pouvait activer la différenciation des promyélocytes en monocytes (Suda, Ueno et al. 2003), qui sont les précurseurs des ostéoclastes. Un autre rôle de choix pour la vitamine D se situe dans le maintien de la glande parathyroïde. En effet, la vitamine D est importante pour la suppression de l'expression PTH (Darwish and DeLuca 1999; Kimmel-Jehan, Darwish et al. 1999). Finalement, un autre rôle de la vitamine D où celle-ci peut être responsable de la suppression du système immunitaire (Yang, Smith et al. 1993; Yang, Smith et al. 1993). Des traitements efficaces utilisant la vitamine D sont d'ailleurs utilisés pour certaines maladies auto-immunes comme la sclérose en plaques, et le diabète de type I, l'arthrite rhumatoïde et le lupus (Lemire, Ince et al. 1992; Cantorna, Hayes et al. 1996; Cantorna, Hayes et al. 1998; Zella and DeLuca 2003).

2.2) Les désordres cliniques reliés au transport du phosphate

Étant donné que le phosphate représente l'un des deux constituants du minéral de l'os, une déplétion de phosphate dans la circulation sanguine et extracellulaire (hypophosphatémie) cause des problèmes de minéralisation de l'os. Cette hypophosphatémie est appelée rachitisme chez l'enfant et ostéomalacie chez l'adulte. Différentes causes génétiques peuvent mener à cette maladie. Par exemple, des mutations au niveau de certains gènes cibles importants pour la régulation du phosphate mènent à l'apparition de la maladie. Il existe deux types d'hypophosphatémies génétiques. Les premières sont reliées au mauvais fonctionnement de l'axe de la vitamine D. Comme il a déjà été mentionné, une diminution de phosphate circulant amène une transformation de la vitamine D inactive en $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$. Des mutations au

niveau des récepteurs de la vitamine D, les VDR ou de la 1α -hydroxylase, une enzyme responsable de la conversion de la vitamine D inactive en vitamine D active, causent de l'hypophosphatémie menant au rachitisme et à l'ostéomalacie. L'autre type est relié à un désordre de réabsorption du phosphate causant une hypophosphatémie et montrant donc les symptômes cliniques du rachitisme et de l'ostéomalacie. De ces maladies, on peut noter l'hypophosphatémie liée au chromosome X (XLH pour X-linked hypophosphatemia), le rachitisme hypophosphatémique héréditaire autosomique avec hypercalciurie (HHRH) et l'hypophosphatémie rachitique autosomale dominante (ADRH). Il existe également une autre forme d'ostéomalacie mais non reliée à des mutations géniques. On parle ici de l'ostéomalacie hypophosphatémique oncogénique (OHO), où l'hypophosphatémie et l'ostéomalacie sont associées à une tumeur et où les symptômes sont semblables aux patients possédant les autres types d'ostéomalacies provoquées par la réabsorption anormale de P_i . Dans cette thèse, seulement les désordres reliés à la mauvaise réabsorption du phosphate seront abordés.

2.2.1) L'hypophosphatémie liée au chromosome X (XLH)

L'hypophosphatémie liée au chromosome X est la forme la plus fréquente des désordres du phosphate et survient à une incidence d'environ 1 :20 000 dans la population. Le gène responsable a été identifié et se nomme PHEX. PHEX (anciennement PEX, a phosphate regulating gene with homologies to endopeptidases on the X chromosome) a été caractérisée en 1995 par un consortium de recherche (1995) lors d'un effort commun afin

d'identifier le gène responsable de l'hypophosphatémie liée au chromosome X (XLH) chez l'humain.

2.2.1.1) Aspects cliniques et biochimiques de XLH

Les patients atteints de XLH ont un retard de croissance, une petite stature et une courbure des os. On peut également dénoter une fréquence plus élevée de pseudo-fractures chez les adultes, mais rarement chez les enfants. Les os sont également moins rigides, ont moins de carbonate et un ratio de calcium : phosphate plus élevé. Au niveau des dents, on observe un retard de la dentition ainsi que des abcès dentaires. L'exposition de la pulpe dentaire est également fréquente, combiné à une bande de prédentine plus large que la normale (Tenenhouse 1999). Des douleurs aux articulations se font également ressentir dû à la calcification des tendons, des ligaments et des articulations. La maladie possède une pénétrance extrêmement variable, des individus dans une même famille peuvent avoir des symptômes légers, tandis que d'autres seront lourdement atteints.

Les signes biochimiques sont également nombreux. Par exemple, on observe, une hypophosphatémie marquée et des niveaux élevés circulants de phosphatase alcaline. Étonnamment, on observe un niveau anormalement bas de $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ qui devrait être augmentée dû au niveau très bas de phosphate circulant. La réabsorption du phosphate est réduite au niveau du rein, mais pas celle des autres molécules filtrées par le rein. Les autres paramètres osseux, à savoir les taux circulants de PTH et de calcium sont normaux. Au niveau de l'os, on remarque une augmentation de la largeur de l'ostéoïde et une diminution du taux de calcification.

2.2.1.2) La mutation du gène *PHEX*, la cause de XLH

Une bonne partie de notre compréhension de la pathophysiologie de l'hypophosphatémie liée au chromosome X a été obtenue par l'utilisation d'un modèle murin pour la maladie, la souris *Hyp*, qui a une grande délétion de la région 3' du gène de *Phex* (Beck, Soumounou et al. 1997). Cette souris montre un phénotype similaire à celui des patients humains atteints de XLH (Eicher, Southard et al. 1976). Deux autres modèles, la souris *Gy* et la souris *Ska 1* possèdent également des mutations pour le gène *Phex* (Strom, Francis et al. 1997; Carpinelli, Wicks et al. 2002). La souris *Gy* présente une délétion de la région 5' du gène ainsi qu'une délétion de la partie d'un autre gène, celui de la spermine synthase qui est situé en amont du gène de *Phex*. La souris *Ska 1*, quant à elle, a été créée par une mutation induite par l'éthylnitrosourée menant à un saut d'exon faisant en sorte que *Phex* n'est pas traduite. Les souris *Hyp* présentent des caractéristiques similaires à la maladie humaine et une quantité de données ont été accumulées avec le temps sur tous les aspects cliniques et biochimiques de la maladie. C'est donc sur ces données obtenues lors d'études chez la souris *Hyp* que la suite de la présentation de la maladie sera présentée, à moins d'avis contraire. Il est intéressant de noter que les femelles hétérozygotes possèdent le phénotype complet de la maladie, possiblement par le fait que la quantité de PHEX exprimée dans le tissu osseux soit trop faible pour exercer sa fonction (Wang, Du et al. 1999). Plus précisément, avec la condensation du chromosome X, une seule cellule sur deux exprimera le gène de PHEX. L'absence de l'expression de PHEX dans les cellules où c'est l'allèle sauvage qui est condensé est suffisante pour déclencher le phénotype de la maladie. Ces cellules pourraient alors possiblement sécréter un facteur venant à l'encontre de la minéralisation. Une partie de cette section comprendra également des données biochimiques sur la protéine PHEX et sur son rôle potentiel dans XLH.

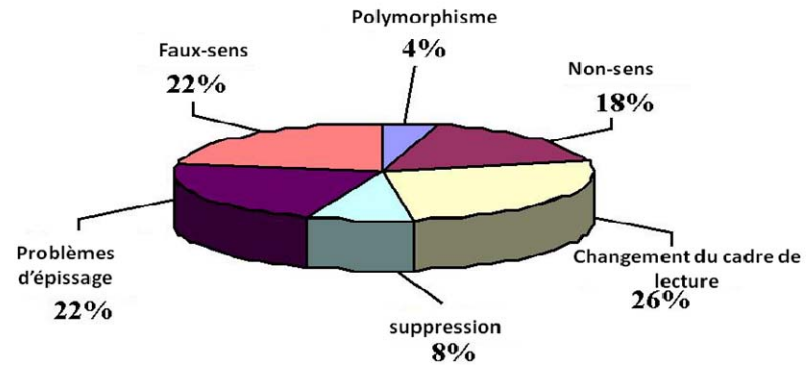


Figure 7: Fréquence des différents types de mutations présentes dans le gène de PHEX (www.phexdb.mcgill.ca).

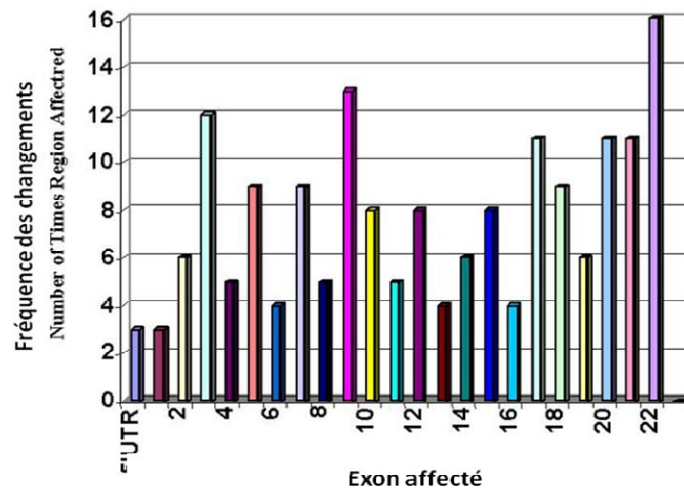


Figure 8: Fréquence des changements dans chaque exon (www.phexdb.mcgill.ca).

2.2.1.2.1) Biochimie de PHEX

Le gène de *PHEX* fait environ 243 kb et contient 22 exons. Comme il a été mentionné précédemment, des mutations dans le gène de PHEX causent l'hypophosphatémie liée au chromosome X. À ce jour, plus de 157 mutations dans le gène de *PHEX* ont été répertoriées. Ces mutations sont distribuées dans toute la longueur du gène et plusieurs concordent avec une perte de fonction de la protéine. Ces mutations sont très diverses et peuvent comprendre des délétions, des changements du cadre de lecture, des mutations non-sens ou des insertions (Francis, Strom et al. 1997; Sabbagh, Boileau et al. 2001; Sabbagh, Boileau et al. 2003). Ces données sont résumées dans les figures 7 et 8.

Les ADNc de *PHEX/Phex* humain et souris ont été clonés et séquencés (Du, Desbarats et al. 1996; Beck, Soumounou et al. 1997; Grieff, Mumm et al. 1997; Guo and Quarles 1997; Strom, Francis et al. 1997; Lipman, Panda et al. 1998). Les comparaisons de séquences d'acides aminés ont démontré des homologies entre la protéine PHEX et les membres de la famille M13 des métalloendopeptidases à zinc. Les peptidases de cette famille sont des glycoprotéines membranaires de type 2 ayant un court domaine N-terminal intracellulaire, un seul passage transmembranaire, et un grand domaine extracellulaire en C-terminal, qui contient le site actif de l'enzyme (Barret, D. et al. 2000). Les peptidases de cette famille peuvent réguler l'activité de peptides biologiquement actifs que ce soit par la dégradation de peptides actifs (neprilysin: NEP, endopeptidase neutre 24.11) (Roques, Noble et al. 1993) ou par l'activation de précurseurs inactifs en leurs formes actives (endothelin converting enzymes 1 et 2; ECE-1 et ECE-2) (Turner 1997). Un alignement de séquence des membres de la famille M13 montre plusieurs motifs conservés, dont le site catalytique. Étant une protéine régulant le métabolisme osseux, aucun homologue de PHEX n'a été trouvé des bactéries aux invertébrés. Le

poisson *Danio rerio* serait l'organisme le plus simple possédant un orthologue de PHEX (Bianchetti, Oudet et al. 2002). Une schématisation des différents membres de la famille de l'endopeptidase neutre, incluant PHEX, est présentée à la figure 9.

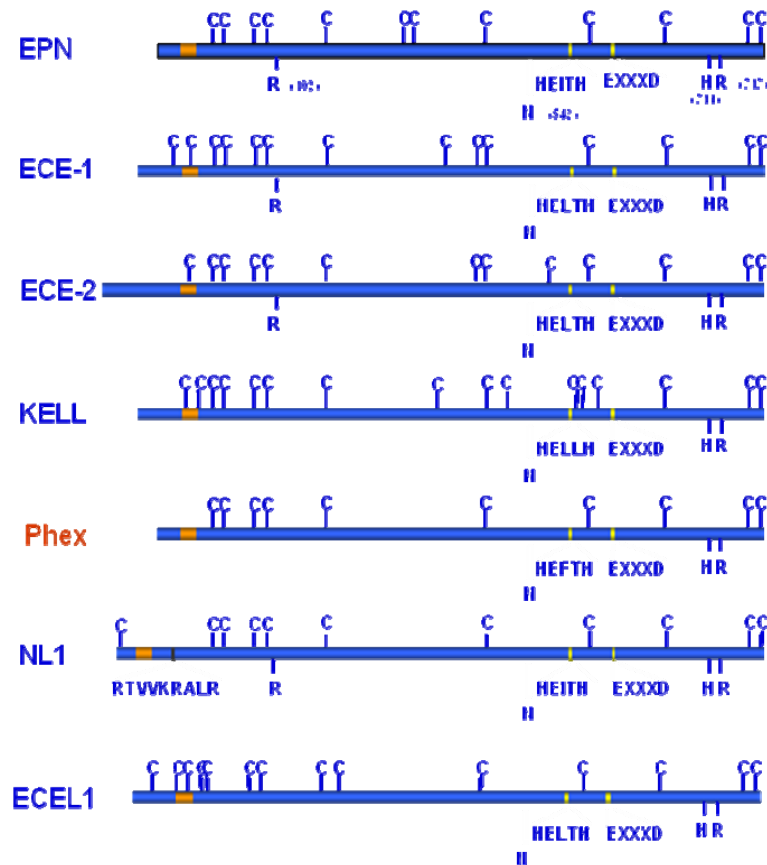


Figure 9: Membres de la famille de l'endopeptidase neutre

PHEX est une protéine de 749 acides aminés. Tout comme les autres membres de la famille, elle possède deux séquences consensus qui sont H₅₈₀-E-X-X-H₅₈₄ et G₆₄₁-E-N-I-A-D₆₄₆. En comparant ces résidus avec ceux de NEP, le membre phare de la famille M13, on peut déduire que ces derniers résidus serviraient à former le site actif. Les résidus H₅₈₀, H₅₈₄ et E₆₄₂ lient l'atome de

zinc du site actif (Crine, Dion et al. 1997). PHEX possède également 10 cystéines qui sont conservées chez les autres membres de la famille. Ces cystéines forment des ponts disulfure qui donneraient la forme tridimensionnelle de l'enzyme (Oefner, D'Arcy et al. 2000). PHEX possède également des sites de N-glycosylation (Asn-X-Ser/Thr). Une digestion à la N-glycosylase F, qui enlève les chaînes d'oligosaccharide liés aux asparagines donne un poids apparent de 87 kDa sur un gel SDS-PAGE (Boileau, Tenenhouse et al. 2001; Sabbagh, Boileau et al. 2001). PHEX est tout d'abord synthétisée comme une protéine glycosylée de 93-95 kDa dans le réticulum endoplasmique. Avec son transport à la membrane plasmique, elle est subséquemment modifiée vers sa forme mature de 100-105 kDa (Sabbagh, Boileau et al. 2001). La spécificité de clivage de PHEX se fait en N-terminal de résidus aspartate suivi d'un acide aminé hydroxylé (Boileau, Tenenhouse et al. 2001; Campos, Couture et al. 2003). Aucun substrat physiologique pour PHEX n'a encore été formellement identifié, mais quelques-uns l'ont été *in vitro* comme la leu-enképhaline (Guo, Liu et al. 2001), le PTH₁₋₃₄, le PTH₁₋₃₈, (Lipman, Panda et al. 1998) le PTHrP₁₀₇₋₁₃₉ (Boileau, Tenenhouse et al. 2001) ainsi que FGF23 (Bowe, Finnegan et al. 2001). FGF23 semblerait finalement ne pas être un substrat de PHEX (Liu, Guo et al. 2003). Son rôle sera discuté plus en détail dans une section ultérieure.

2.2.1.2.3) Localisation et régulation de PHEX

Plusieurs études soutiennent un rôle de PHEX dans la minéralisation osseuse. L'ARNm de *PHEX* ainsi que la protéine sont localisés d'une manière prédominante dans l'os et les dents, en particulier dans les ostéoblastes, ostéocytes et odontoblastes, mais pas dans les pré-ostéoblastes (Du, Desbarats et al. 1996; Beck, Soumounou et al. 1997; Guo and Quarles 1997; Ruchon, Marcinkiewicz et al. 1998; Ruchon, Tenenhouse et al. 2000; Thompson,

Sabbagh et al. 2002). L'ARNm de *PHEX* a également été détecté dans le cerveau, les reins, les poumons, le thymus, le cœur et les muscles squelettiques (Meyer, Young et al. 2000). Durant le développement des os *in vivo* ou même pendant la différenciation des ostéoblastes *in vitro*, l'expression de l'ARNm de *PHEX* et de la protéine est temporellement associée avec la minéralisation (Ecarot-Charrier, Glorieux et al. 1988; Guo and Quarles 1997; Ruchon, Marcinkiewicz et al. 1998; Meyer, Young et al. 2000; Ruchon, Tenenhouse et al. 2000; Thompson, Sabbagh et al. 2002). Des études *in vivo* et *in vitro* ont démontré que la perte de fonction de *Phex* dans les ostéoblastes cause un défaut intrinsèque du processus de minéralisation (Ecarot-Charrier, Glorieux et al. 1988; Ecarot, Glorieux et al. 1992; Xiao, Crenshaw et al. 1998; Miao, Bai et al. 2001). Cependant, le mécanisme par lequel des mutations dans le gène de *Phex* causent la perte de phosphate au niveau des tubules proximaux du rein ainsi qu'un défaut de la minéralisation de l'os chez les patients XLH et les souris *Hyp* n'est pas encore bien connu. Il a été postulé que PHEX inactiverait un facteur responsable de la diminution de la réabsorption de phosphate au niveau du rein. Ce facteur a été nommé phosphatonine. Les sections ultérieures traiteront du rôle potentiel de PHEX dans la maladie et chez les souris *Hyp*.

Bien qu'il soit très bien documenté que PHEX est impliqué dans le contrôle de l'homéostasie du phosphate et de la minéralisation osseuse, peu d'informations à propos de la régulation de l'expression de PHEX sont encore disponibles. Notre laboratoire et d'autres ont démontré que l'expression de PHEX était régulée à la baisse par le PTHrP et le PTH, des hormones affectant le métabolisme osseux (Vargas, St-Louis et al. 2003; Alos and Ecarot 2005). Cette diminution de l'expression est médiée par l'activation de la voie de l'AMPc/PKA (Vargas, St-Louis et al. 2003). Il a aussi été rapporté que l'expression de *Phex* est régulée à la baisse par la vitamine D3 dans des cultures primaires d'ostéoblastes de calvarias, de tibias, dans la lignée cellulaire MC3T3

et dans la glande parathyroïde (Ecarot and Desbarats 1999; Brewer, Canaff et al. 2004). De plus, il a également été rapporté que le niveau d'expression de *Phex* est régulé à la hausse par les glucocorticoïdes dans la lignée cellulaire UMR-106 (Hines, Collins et al. 2002). Les niveaux de l'ARNm de *Phex* sont régulés à la hausse par les glucocorticoïdes dans des cultures primaires de calvarias. L'IGF-I (insulin-like growth factor) et l'hormone de croissance ont le même effet dans les calvaria et les poumons (Zoidis, Zapf et al. 2000; Hines, Collins et al. 2002; Zoidis, Gosteli-Peter et al. 2002). Le promoteur murin de *Phex* a été cloné et séquencé et celui-ci présente plusieurs sites de liaison aux facteurs de transcription comme des éléments de réponse à l'AMPc (CRE), des éléments de réponse aux glucocorticoïdes (GRE), des éléments de réponse aux oestrogènes (ERE) ainsi que des éléments AP-1 et AP-4 (activator protein-1, activator protein-4) (Hines, Collins et al. 2000). Le TNF- α injecté à des souris régule également l'ARNm de *Phex* à la baisse. PHEX pourrait donc possiblement être responsable de la diminution de la densité osseuse chez les patients souffrant de colites ulcéreuses, chez qui le TNF- α est augmenté (Uno, Kolek et al. 2006).

2.2.1.2.2) Rôle physiologique potentiel de PHEX

Le ou les substrats physiologiques de PHEX ne sont pas connus. Cependant, deux molécules attirent l'attention. Il s'agit de FGF23 et de MEPE. FGF23 est une protéine impliquée dans le métabolisme du phosphate et sera traitée dans une section ultérieure. Une étude a avancé que PHEX était en mesure de cliver FGF23 (Bowe, Finnegan et al. 2001) mais deux autres études ont également démontré l'incapacité de PHEX à cliver FGF23 sous sa forme sauvage (Campos, Couture et al. 2003; Benet-Pages, Lorenz-Depiereux et al. 2004). Il est intéressant de noter que les souris *Hyp* présentent des taux circulants de FGF23 beaucoup plus élevés que des souris sauvages. Chez des

patients atteints de XLH, cette augmentation n'est pas observée chez tous les individus. Une étude a démontré une augmentation de FGF23 chez 13 patients sur 21 (Jonsson, Zahradnik et al. 2003) tandis qu'une autre étude n'a pas démontré de changements chez 11 patients XLH par rapport aux individus contrôles (Weber, Liu et al. 2003). Il est donc possible que PHEX augmente la transcription de FGF23 par un mécanisme encore inconnu (Liu, Guo et al. 2003). La figure 10 fait état de ces découvertes.

Une autre protéine qui pourrait être un substrat de PHEX est la protéine MEPE. MEPE fait partie de la famille des SIBLINGS tel que mentionné précédemment. Ces protéines contiennent un motif ASARM. Ce motif acide permettrait d'inhiber la minéralisation. Rowe et collaborateurs ont suggéré que PHEX pouvait se lier et prévenir la libération du motif ASARM par la cathepsine B (Guo, Rowe et al. 2002). Ce même groupe a aussi établi par résonance de surface que PHEX pouvait lier MEPE (Rowe, Garrett et al. 2005). L'absence de PHEX causerait alors la libération excessive du peptide ASARM, ce qui mènerait à l'inhibition de la minéralisation. Le peptide ASARM ainsi que la protéine MEPE sauvage peuvent aussi inhiber l'activité de PHEX de façon dose dépendante laissant suggérer un rôle pour MEPE sur l'activité de PHEX et sur l'augmentation de l'expression de FGF23 lors de la minéralisation (Liu, Rowe et al. 2007).

2.2.1.4) Le métabolisme du phosphate chez les souris *Hyp* et XLH

Le transport défectueux du phosphate au niveau rénal chez les souris *Hyp* est causé par une diminution de l'expression rénale des co-transporteurs sodium/phosphate de type I et II tant au niveau de l'ARNm qu'au niveau de la protéine (Tenenhouse, Werner et al. 1994; Beck, Tenenhouse et al. 1996;

Tenenhouse, Roy et al. 1998). On observe une diminution d'environ 50% pour le cotransporteur de type II et de l'ordre de 20% pour le cotransporteur de type I, (voir la figure 10). Il est intéressant de noter que la diminution de la réabsorption de phosphate demeure même après une parathyroïdectomie de l'animal. L'ablation des glandes parathyroïdes empêche le PTH de causer une résorption osseuse par une diminution de l'absorption et une augmentation de l'excrétion du phosphate. Ceci veut dire que le défaut de la réabsorption du phosphate chez les souris *Hyp* est indépendant du PTH. Un autre phénomène intéressant est que les souris *Hyp* présentent une capacité à diminuer l'excrétion du phosphate par les cellules rénales lors d'une diète pauvre en phosphate. Cependant, les niveaux de phosphate circulants demeurent beaucoup plus bas que les souris de type sauvage (Tenenhouse and Scriver 1979; Tenenhouse and Scriver 1979; Tenenhouse, Meyer et al. 1992). Cette diminution de l'excrétion est due à l'augmentation de l'ARNm et de la protéine pour le cotransporteur NaPi de type 2 (Tenenhouse, Martel et al. 1995; Beck, Tenenhouse et al. 1996).

La diminution du transport du phosphate au niveau du rein chez les souris *Hyp* doit être attribuée à la perte de la fonction de PHEX puisque c'est ce gène qui est muté chez ces souris. Cependant, PHEX n'est pas exprimé au niveau du rein (Ruchon, Marcinkiewicz et al. 1998; Ruchon, Tenenhouse et al. 2000). Quelques expériences démontrent avec éloquence qu'un facteur humoral doit être responsable des symptômes de XLH. Premièrement, des expériences de parabioses ont été effectuées (Meyer, Meyer et al. 1989). Ces expériences ont mis en commun les appareils circulatoires d'une souris *Hyp* et d'une souris de type sauvage. Après trois semaines, les niveaux de phosphate circulants chez la souris de type sauvage s'approchaient des niveaux de la souris *Hyp*. De plus, même une parathyroïdectomie ne corrige pas les niveaux de phosphate chez la souris sauvage lors de cette expérience de parabiose (Meyer, Meyer et al. 1989). Cette diminution de réabsorption du phosphate est spécifique puisque le

transport du glucose, lui aussi dépendant du sodium, n'est pas affecté (Meyer, Meyer et al. 1989). L'explication la plus logique de cette expérience est qu'un facteur circulant chez la souris *Hyp* est transmis dans la circulation à la souris de type sauvage, ce qui cause chez elle une diminution de la réabsorption du phosphate au niveau de ses reins. Cependant, il n'est pas encore bien compris pourquoi PHEX, qui est exprimée chez la souris de type sauvage, ne peut pas rétablir le phénotype lors de cette expérience. Il est suggéré qu'il est possible que Phex ne puisse dégrader le facteur humoral avant que celui-ci n'agisse aux reins puisque Phex est exprimé principalement dans les os.

Une autre expérience démontrant qu'un facteur humoral est responsable de XLH vient de la transplantation croisée de reins *Hyp* et de souris normales (Nesbitt, Fujiwara et al. 1999). Lorsqu'un rein d'une souris sauvage est transplanté chez une souris *Hyp*, on peut observer que la quantité de phosphate réabsorbé par ce rein diminue jusqu'à ce que la souris soit autant hypophosphatémique qu'avec des reins de souris *Hyp*. À l'inverse, lorsqu'il y a transplantation de reins provenant de souris *Hyp* dans des souris sauvages, on observe une hypophosphatémie au départ qui se corrige avec le temps. Ceci suggère également la présence d'une hormone phosphaturique circulante, qui n'est pas transférée avec les reins. Cette hormone n'est donc clairement pas produite par cet organe. Cette hormone hypothétique a été appelée phosphatonine (Econs and Drezner 1994) et serait responsable de la perte de phosphate au niveau du rein. Conformément à cette hypothèse, deux groupes ont rapporté la présence d'une activité inhibitrice du transport du phosphate au niveau du rein dans le milieu conditionné de cultures d'ostéoblastes isolés des souris *Hyp* (Shimada, Mizutani et al. 2001; Schiavi and Moe 2002).

Plus récemment, une étude du groupe de Drezner a mis en évidence que l'absence d'expression de PHEX dans la lignée ostéoblastique pouvait à elle

seule être à l'origine d'un défaut de minéralisation. Pour ce faire, ils ont généré des souris où l'absence du gène de *Phex* est médiée uniquement dans la lignée ostéoblastique grâce à l'utilisation du promoteur de l'ostéocalcine, spécifique à cette lignée. Ils ont remarqué que les défauts de minéralisation sont similaires à ceux des souris *Hyp* (Yuan, Takaiwa et al. 2008). De plus, l'expression de FGF23 est augmentée radicalement chez ces souris comparativement aux souris sauvages. Ceci amène alors à affirmer que c'est l'absence d'expression de PHEX au niveau des ostéoblastes qui est responsable du phénotype XLH.

2.2.1.5) Le métabolisme de la vitamine D chez les souris *Hyp* et XLH

Comme il a été mentionné précédemment, les souris *Hyp* présentent une régulation anormale du métabolisme de la vitamine D. En effet, l'hypophosphatémie engendrée devrait causer une augmentation importante de la conversion de la $25(\text{OH})\text{D}_3$ en $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, ce qui n'est pas le cas. Une étude a même démontré qu'une diminution des niveaux de phosphate circulant chez les souris *Hyp* provoque une diminution de la conversion de la vitamine D sous sa forme active tandis qu'une augmentation de ce même phosphate circulant entraîne une augmentation de la conversion de la vitamine D. Chez les souris sauvages, c'est le contraire qui est observé dans les deux cas présentés (Tenenhouse and Jones 1990; Tenenhouse, Meyer et al. 1992). Ces dérèglements dans le métabolisme de la vitamine D chez la souris *Hyp* sont associés aux enzymes faisant la conversion de cette dernière. Premièrement, l' α -1 hydroxylase, l'enzyme de la conversion de la vitamine D inactive en vitamine D active (la $25(\text{OH})\text{D}_3$ en $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$) possède un V_{max} diminué sans changement dans son K_m chez les souris *Hyp* (Tenenhouse 1984; Carpenter and Shiratori 1990). Lorsqu'on soumet des souris sauvages à une diète pauvre en phosphate ou lorsqu'on leur administre du PTH, on observe une

augmentation de l'activité de l'enzyme ainsi qu'une augmentation des transcrits. Chez les souris *Hyp*, on observe une augmentation similaire des transcrits de l'enzyme sans observer toutefois une augmentation de l'activité de la 1- α -hydroxylase lorsqu'elles sont soumises à ces deux mêmes traitements (Fujiwara, Aravindan et al. 2003). Il y a donc une modification de l'activité de la 1- α -hydroxylase. Ce fait est démontré dans la figure 10. Dans un deuxième temps, la α -24 hydroxylase, l'enzyme responsable du catabolisme de la vitamine D de la souris *Hyp* montre une augmentation de son ARNm et de sa protéine, ainsi que du Vmax chez les souris *Hyp* (Roy, Martel et al. 1994; Roy and Tenenhouse 1996). La quantité de vitamine D active s'en trouve donc diminuée. PHEX pourrait donc avoir un rôle direct ou indirect dans le métabolisme de la vitamine D. L'absence de PHEX, chez les souris *Hyp*, pourrait affecter le métabolisme de la vitamine D soit en empêchant l'activation de la phosphatonine, ce qui aurait pour effet d'empêcher la conversion de la vitamine D inactive en vitamine D active ou soit en empêchant la dégradation de la phosphatonine qui aurait un effet négatif sur la conversion de la vitamine D inactive en vitamine D active. Ce concept ou Phex aurait pour rôle d'activer ou d'inactiver la phosphatonine a été expliqué précédemment.

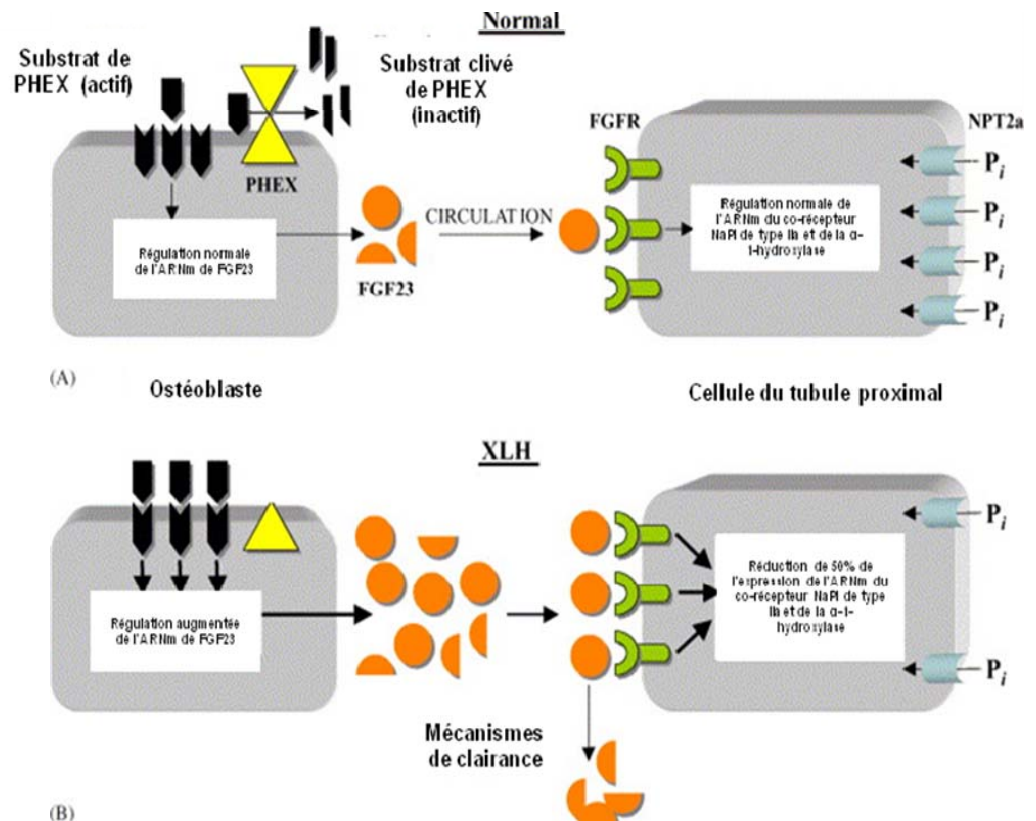


Figure 10: Fonctionnement potentiel de PHEX au niveau des os et des reins (modifié de Yu and White 2005).

2.2.1.6) Le tissu osseux chez les souris *Hyp* et XLH

Lorsque des ostéoblastes de souris sauvages sont transplantés dans des souris *Hyp* ou que des ostéoblastes de souris *Hyp* sont transplantés dans des souris sauvages et que ces souris sont soumises à carence en phosphate, l'os produit est anormal et présente des défauts de minéralisation (Ecarot, Glorieux et al. 1992). Cependant, si on donne des suppléments de phosphates aux souris, on peut voir une amélioration de la minéralisation sans toutefois observer une correction (Ecarot, Glorieux et al. 1992). La cause du défaut de minéralisation

n'est pas connue, mais des ostéoblastes *Hyp* présentent plusieurs anomalies. Des cultures primaires d'ostéoblastes provenant de calvarias de souris *Hyp* démontrent par exemple une réduction de l'activité caséine kinase et une diminution de la phosphorylation de l'ostéopontine (Rifas, Cheng et al. 1997). L'expression de certaines protéines est également modifiée chez les ostéoblastes des souris *Hyp*. Par exemple, la BSP et la vitronectine voient leur expression diminuée au niveau de la protéine et de l'ARNm tandis que l'expression du biglycan et de la fibrillin-1 est augmentée tant pour la protéine que pour leur ARNm (Miao, Bai et al. 2001). D'autres paramètres sont normaux chez les cultures d'ostéoblastes de souris *Hyp* comme par exemple l'activité de la phosphatase alcaline ainsi que la synthèse de collagène et l'expression de l'ostéocalcine (Carpenter, Moltz et al. 1998).

Le cartilage est également altéré chez les souris *Hyp*. Par exemple, l'expression de l'ostéocalcine, de la BSP et de MMP9 est diminuée au niveau des chondrocytes hypertrophiques tandis que l'expression de l'ostéonectine est augmentée (Miao, Bai et al. 2004). Le défaut au niveau des chondrocytes est possiblement indirect. Il a été établi que c'est l'hypophosphatémie et non nécessairement des mutations de *Phex* qui peut causer une diminution de l'apoptose des chondrocytes hypertrophiques, résultant alors en un phénotype de rachitisme (Sabbagh, Carpenter et al. 2005).

Plusieurs études ont tenté de rétablir PHEX dans les souris *Hyp* afin d'éradiquer les symptômes de la maladie. Malgré le fait que PHEX est responsable de XLH, son expression dans les souris *Hyp* ne donne que des succès mitigés. Premièrement, deux études ont utilisé des promoteurs spécifiques au tissu osseux à savoir le promoteur du pro-collagène 1 α 1 et celui de l'ostéocalcine (Bai, Miao et al. 2002; Liu, Guo et al. 2002) respectivement. Les deux études ont montré une amélioration des défauts osseux mais en étant

incapable d'améliorer l'hypophosphatémie. Ceci veut donc dire que l'expression de PHEX sous un promoteur spécifique aux ostéoblastes est insuffisante pour corriger le phénotype de XLH. Une autre étude utilisant un promoteur de la β -actine afin d'exprimer PHEX dans les souris *Hyp* dans une plus grande variété de tissus a donné les mêmes résultats que les études précédentes. L'expression spatiale et temporelle de PHEX est donc essentielle pour la minéralisation et la régulation des niveaux de phosphate circulants (Erben, Mayer et al. 2005).

Peu d'études traitent des autres cellules pouvant minéraliser, les odontoblastes. Il a quand même été démontré que les dents des souris *Hyp* exprimaient une quantité réduite de l'ARNm du cotransporteur NaPi IIb comparativement aux souris sauvages. Les odontoblastes pourraient donc posséder également des défauts intrinsèques de minéralisation dus à l'absence de PHEX chez les souris *Hyp* (Onishi, Okawa et al. 2007).

2.2.2) le rachitisme hypophosphatémique héréditaire autosomique avec hypercalciurie (HHRH)

Le rachitisme hypophosphatémique héréditaire autosomique avec hypercalciurie (HHRH) est une maladie qui a été décrite pour la première fois chez les Bédouins. La différence avec XLH ou ADHR réside dans le fait que les niveaux de $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ sont élevés, afin de contrer l'hypophosphatémie (Tieder, Modai et al. 1985). Le gène responsable de la maladie a été identifié récemment et s'avère être le cotransporteur NaPi IIc. Des études tant chez la souris que chez l'homme montrent une réduction d'environ 80% du transport du phosphate au niveau du rein, une hypercalciurie, une augmentation de la

1,25(OH)₂D₃ ainsi qu'une diminution de PTH dans le plasma (Beck, Karaplis et al. 1998; Prie, Huart et al. 2002).

2.2.2.1) Aspects cliniques et biochimiques de HHRH

Les patients présentant cette forme de rachitisme ont une petite taille, une excrétion rénale de phosphate élevée et une hypercalciurie. Les quantités circulantes de la 1,25(OH)₂D₃ sont augmentées d'environ 4 fois par rapport à des individus normaux. Ceci résulte en l'augmentation de l'absorption intestinale de calcium ce qui entraîne l'hypercalciurie sans hypercalcémie observée et des taux bas de PTH (Beraud, Perimenis et al. 2005). Les patients possèdent également des lésions ostéomalaciques et ont une activité élevée de la phosphatase alcaline (Tieder, Modai et al. 1985). En ce qui a trait aux os, l'ostéoïde est plus grand que chez les individus sains. On observe également un délai dans la minéralisation (Gazit, Tieder et al. 1991).

2.2.3) *L'hypophosphatémie rachitique autosomale dominante (ADRH)*

L'hypophosphatémie rachitique autosomale dominante (ADRH) est une maladie qui cause de l'hypophosphatémie accompagnée de défauts de minéralisation au même titre que XLH. Un consortium de recherche a identifié le gène responsable de cette maladie qui s'avère être le « fibroblast growth factor 23 » ou FGF23 (2000).

2.2.3.1) Aspects cliniques et biochimiques de ADHR

ADHR, tout comme XLH, est caractérisée par une hypophosphatémie due à une perte de phosphate par les reins, des niveaux de PTH normaux, mais un niveau anormalement bas de $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$. On observe également une déformation des extrémités. La maladie possède une pénétrance variable (Beraud, Perimenis et al. 2005). Les patients souffrants d'ADHR peuvent être divisés en deux sous-groupes. Le premier où les symptômes apparaissent au cours de l'enfance et ressemblent à ceux observés chez les patients XLH et le deuxième où les symptômes apparaissent plus tard au cours de la vie et ressemblent plus à ceux observés chez les patients atteints d'ostéomalacie oncogénique.

2.2.3.2) FGF23, la cause de ADHR

Il a été déterminé que la cause de la maladie ADHR réside dans des mutations de la protéine FGF23. FGF23 est un membre de la famille des « fibroblast growth factors ». Trois mutations ont été identifiées et ces mutations empêchent le clivage de FGF23 en divers fragments. La transfection de FGF23 sous sa forme mutée dans des cellules en culture ne démontre qu'un seul fragment de 32 kD tandis que la forme sauvage de FGF23 génère deux fragments de 32 et 12 kD lorsqu'est utilisé un anticorps reconnaissant la partie C-terminale de FGF23 (White, Carn et al. 2001). Cette même étude a utilisé des anticorps reconnaissant la partie N-terminale de FGF23 et a montré des fragments de 18 et 32 kD. Le site de clivage de FGF23 fait en sorte que des fragments de 18 et 12 kD sont produits. La maladie serait alors causée par le FGF23 pleine longueur et non par les produits de clivage (Bowe, Finnegan et al. 2001; Shimada, Mizutani et al. 2001; White, Carn et al. 2001; White,

Jonsson et al. 2001). Des animaux surexprimant FGF23 sous sa forme mutée ont des niveaux bas de phosphate circulant, une élévation de l'excrétion de phosphate dans l'urine ainsi que des niveaux bas de $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ comparativement à des souris surexprimant la forme sauvage de FGF23 (2000). FGF23 porte une séquence consensus RXXR au niveau des acides aminés 176-179 et est clivé par la furine un membre de la famille des pro-hormones convertases entre les résidus 179-180 (Benet-Pages, Lorenz-Depiereux et al. 2004). C'est le fragment N-terminal qui contient le fragment de liaison au FGFR tandis que le fragment C-terminal est le domaine plus spécifique à FGF23. Ce clivage se fait au niveau du réticulum endoplasmique (Liu, Guo et al. 2003).

2.2.3.2.1) Biochimie de FGF23

FGF23 est exprimé par une variété de tissus incluant le cœur, les glandes parathyroïdes, le cerveau, le foie et le thymus des souris adultes (Yamashita, Yoshioka et al. 2000; Shimada, Mizutani et al. 2001). FGF23 est également exprimé dans les os où il est maintenant établi que c'est dans cet organe que FGF23 est exprimé le plus abondamment. FGF23 est exprimé par les ostéocytes des os plats et longs ainsi que dans les régions de formation osseuse active (Liu, Guo et al. 2003; Riminucci, Collins et al. 2003). Comme mentionné plus tôt, des mutations dans le site consensus de clivage par les prohormones convertases causent ADHR. Les deux fragments générés par le clivage, lorsque injectés à des souris ne sont pas capables de réduire les taux de phosphate dans le sérum comparativement à l'injection de FGF23 pleine longueur (Shimada, Muto et al. 2002). Cependant, une étude récente a démontré qu'une partie du fragment C-terminal pouvait induire l'excrétion de phosphate chez le rat même en absence du domaine de liaison aux récepteurs des FGF (Berndt, Craig et al. 2007). De plus, la forme mutée de FGF23-R176Q semble

encore plus apte que le FGF23 sauvage à réduire le transport du phosphate lorsque des tumeurs arborant cette mutation sont injectées dans les souris (Bai, Miao et al. 2003; Bai, Miao et al. 2004). FGF23 contribue à la réabsorption tubulaire du phosphate de façon indépendante au PTH. Il a été démontré que les niveaux de FGF23 étaient faibles lorsqu'une diète faible en phosphate était administrée et augmentaient drastiquement lors d'un apport excessif en phosphate dans la nourriture (Ferrari, Bonjour et al. 2005). Des patients souffrant d'insuffisance rénale montrent également une augmentation des quantités circulantes de FGF23 par rapport à des individus sains. Le rein ne fonctionnant qu'à un faible pourcentage de sa capacité, l'augmentation de phosphate circulant non filtré par le rein fait en sorte que FGF23 est à son tour augmenté (Weber, Liu et al. 2003). L'administration de vitamine D peut réguler à la hausse l'expression sérique de FGF23. De plus, cette augmentation est encore plus importante lorsqu'on administre de la vitamine D à des souris *Hyp*. Ceci veut donc dire que la vitamine D potentialise l'expression de FGF23 (Kolek, Hines et al. 2005; Liu, Tang et al. 2006).

D'autres maladies du métabolisme du phosphate impliquent une régulation des quantités circulantes de FGF23. Dans une forme d'hypophosphatémie autosomale récessive (2000), DMP-1, un membre de la famille des SIBLINGs mentionnés précédemment peut affecter FGF23. Des mutations de DMP-1 ainsi que des souris ayant subi une ablation génique du gène *DMP-1* montrent des quantités circulantes élevées de FGF23 et montrent également une hypophosphatémie importante (Feng, Ward et al. 2006; Lorenz-Depiereux, Bastepe et al. 2006). Ensuite, la lipocalcinogranulomatose symétrique est due à des mutations dans le gène de *FGF23*. Ces mutations confèrent le même phénotype que les souris où le gène *FGF23* a été inactivé à savoir une hyperphosphatémie et une calcification ectopique (Shimada, Kakitani et al. 2004; Sitara, Razzaque et al. 2004; Benet-Pages, Orlik et al.

2005). De plus, en ce qui a trait à cette maladie, des mutations de la protéine GALNT3, causent des niveaux circulants faibles de FGF23 pleine longueur, mais une quantité importante du produit clivé du fragment C-terminal (Garringer, Fisher et al. 2006). Il a été montré récemment que FGF23 était glycosylé sur la thréonine 178 dans le site de clivage par la furine. Cette glycosylation se ferait par la GALNT3 (Kato, Jeanneau et al. 2006). La glycosylation de FGF23 aurait un rôle protecteur sur son clivage. Une autre étude a fait le lien entre la glycosylation de FGF23 et GALNT3. En effet, une mutation de GALNT3 empêcherait la glycosylation efficace de FGF23, ce qui faciliterait son clivage par la furine (Frishberg, Ito et al. 2007).

FGF23 lie les récepteurs aux FGF (FGFR). Ces récepteurs sont de la famille des récepteurs tyrosine kinase et sont composé d'un domaine de liaison au ligand, d'un seul passage transmembranaire, et d'un domaine a activité tyrosine kinase (Ruta, Burgess et al. 1989). Il existe quatre sous-types de récepteurs aux FGF (FGFR1-4). Par épissage alternatif, ils peuvent aussi donner différentes isoformes, les isoformes b et c si c'est l'exon 8 ou 9 qui est inclus, respectivement (Ornitz, Xu et al. 1996). FGF23 se lie avec une grande affinité au récepteur FGFR1c FGFR2c et FGFR3c de même qu'au FGFR4 sans toutefois lier les isoformes b. De plus, il semblerait que les glycoaminoglycans et l'héparine puissent potentialiser la liaison de FGF23 à ses récepteurs (Baum, Schiavi et al. 2005; Yu, Ibrahimi et al. 2005). Des quatre types de récepteurs pour les FGFs, c'est le sous-type c qui est le plus abondamment exprimé au niveau des tubules rénaux (Yamashita, Konishi et al. 2002). Des souris chez qui les gènes *Fgfr1* et *Fgfr2* ont été inactivés meurent pendant la gestation (Deng, Wynshaw-Boris et al. 1994; Xu, Lee et al. 1998). De plus, des souris chez qui les gènes *Fgfr3* et *Fgfr4* ont été inactivés ne montrent pas de phénotypes par rapport au phosphate (Weinstein, Xu et al. 1998). Une certaine redondance peut être envisageable si l'on tient en compte que plusieurs

récepteurs sont exprimés dans des tissus différents. L'ablation d'un récepteur serait donc compensée par les autres récepteurs présents dans lesdits tissus. Avec la présence de phénotypes distincts de XLH non reliés au métabolisme du phosphate comme ceux énumérés précédemment, il est possible de postuler que c'est la liaison de FGF23 aux différents isoformes des récepteurs FGFR qui cause ces divers phénotypes. L'étude de la liaison de FGF23 à ces différents isoformes ainsi que du tissu d'expression de ces récepteurs mènera à l'élaboration d'antagonistes afin de régler ces différents phénotypes.

FGF23 a besoin du cofacteur klotho pour lier son récepteur avec une plus grande affinité que la liaison seule de FGF23 (Kurosu, Ogawa et al. 2006). Sommairement, cette étude a montré que des cellules ne répondant pas à FGF23 induisent une réponse cellulaire lorsque Klotho est présent. Cette réponse implique la phosphorylation d'ERK, NGFIA et NAB2, des médiateurs cellulaires de la signalisation de FGF23 (Urakawa, Yamazaki et al. 2006; Fukuda, Kanomata et al. 2007). De plus, ce groupe montre que FGF23 ne peut pas phosphoryler ERK dans des cellules L6, qui ne possèdent pas de récepteurs pour les FGFs et ce, même après l'ajout de klotho. D'autres études ont besoin d'être effectuées afin de mieux caractériser le complexe FGF23-FGFR et klotho. C'est le fragment C-terminal qui est pressenti pour effectuer cette fonction (Goetz, Beenken et al. 2007). Il a également été montré que Klotho peut lier tous les récepteurs FGFR avec des affinités différentes (Kurosu, Ogawa et al. 2006). Klotho est une protéine de 1014 acides aminés contenant un peptide signal à son extrémité N-terminale ainsi qu'un seul passage transmembranaire. Son domaine extracellulaire peut être clivé et est détectable dans le sang. Klotho pourrait donc agir comme une hormone dans la circulation. Klotho possède deux motifs répétés nommés KL-1 et KL-2. Klotho est retrouvé principalement dans les organes régulant l'homéostasie du calcium comme par exemple les tubules rénaux, la glande parathyroïde et l'épithélium

du plexus choroïde dans le cerveau (Matsumura, Aizawa et al. 1998). L'inactivation de *Klotho* chez les souris augmente le vieillissement chez ces dernières (Kuro-o, Matsumura et al. 1997). De plus, ces souris possèdent des concentrations sériques de phosphate et de $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ élevées (Kuro-o, Matsumura et al. 1997; Yoshida, Fujimori et al. 2002). L'augmentation du phosphate circulant est due à une activité ainsi qu'une plus grande abondance des cotransporteurs NaPi IIa et NaPi IIc tant au niveau de la protéine que de l'ARNm. On peut également noter que les souris *Klotho* *-/-* ont un niveau augmenté de FGF23 dans la circulation comparativement à des souris sauvages (Segawa, Yamanaka et al. 2007). De plus, les souris *Fgf23* *-/-* possèdent les mêmes caractéristiques de vieillissement que les souris *Klotho* *-/-* (Razzaque, Sitara et al. 2006) dévoilant une cascade de signalisation potentielle entre *klotho* et FGF23. Il a donc été démontré que FGF23 liait son récepteur avec une plus grande affinité lorsque *klotho* était présent (Urakawa, Yamazaki et al. 2006).

2.2.3.3) Le métabolisme du phosphate chez les patients ADHR

Le mutant FGF23-R179Q cause une hypophosphatémie en diminuant le nombre de cotransporteurs NaPi de type IIa et IIc (Bowe, Finnegan et al. 2001). Un autre mutant du site de clivage par les pro-hormones convertases FGF23-R176Q, lorsque surexprimé chez la souris, cause une plus grande hypophosphatémie, accompagnée d'une plus grande réduction de l'activité de la 1- α -hydroxylase comparativement à la surexpression de FGF23 sous sa forme sauvage (Bai, Miao et al. 2003). Ces études sont complémentées par des études utilisant la protéine sauvage. FGF23, lorsqu'administré à des souris peut réduire l'activité du cotransport NaPi IIa (Saito, Kusano et al. 2003). De plus, d'autres

études ont aussi montrées que FGF23 sous sa forme sauvage, lorsque surexprimé dans des cellules OK induit l'internalisation du récepteur NaPi IIa ainsi qu'une diminution de l'abondance de son ARNm (Larsson, Marsell et al. 2004; Shimada, Urakawa et al. 2004). Des cellules OK, qui sont des cellules de reins d'opossums, surexprimant FGF23 ont également été transplantées dans des souris nues et ces souris développent une hypophosphatémie sévère (Shimada, Mizutani et al. 2001).

Des souris ayant subi une ablation génique pour le gène *Fgf23* sont à l'inverse des études de surexpression, c'est-à-dire qu'elles ont des concentrations de phosphate et de $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ dans la circulation plus élevées que les souris de type sauvage (Shimada, Kakitani et al. 2004; Sitara, Razzaque et al. 2004). Cette augmentation est causée par une présence accrue du cotransporteur NaPi IIa à la membrane des cellules rénales comparativement aux souris sauvages, résultant en une plus grande réabsorption de phosphate. Ces souris présentent également d'autres caractéristiques non reliées au métabolisme du phosphate comme par exemple des organes reproductifs immatures, une atrophie du thymus, des niveaux sériques de triglycérides diminués et une augmentation du niveau de cholestérol et une hypoglycémie. FGF23 pourrait avoir d'autres rôles locaux sur ces organes, en concordance avec les rôles multiples des autres membres de la famille des FGFs. Le groupe de Lanske (Sitara, Razzaque et al. 2004) a de plus créé des souris ayant subi une ablation génique du gène *Fgf23* dans le contexte génétique des souris *Hyp*. Les souris présentent un phénotype de souris chez qui le gène *Fgf23* a été inactivé. Elles sont donc hyperphosphatémiques avec une concentration élevée de $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$. Le même résultat a été obtenu par un autre groupe de chercheurs qui en plus a fusionné le gène de l'eGFP au promoteur de *Fgf23*. Ils observent que l'expression de eGFP est augmentée chez les souris *Hyp* (Liu, Zhou et al. 2006). De façon intéressante, ils notent que l'eGFP est exprimée et

augmentée au niveau des ostéocytes de la lignée *Hyp*, mais pas au niveau des ostéoblastes, un des lieux d'expression de PHEX, avec les ostéocytes (Liu, Zhou et al. 2006). Toutes ces données indiquent clairement que FGF23 agit en aval de PHEX, à savoir que PHEX régule probablement les quantités de FGF23.

Les résultats présentés précédemment suggèrent que FGF23 est un régulateur négatif de la concentration du phosphate dans le sérum. Qu'en est-il de l'expression de FGF23 lorsqu'un excès de phosphate est administré? Trois études traitent de ce sujet et montrent des données discordantes. La première ne montre pas d'augmentation des quantités de FGF23 tel qu'attendu, la deuxième rapporte une légère augmentation de FGF23 dans la circulation chez des patients humains et la dernière montre que l'administration de phosphate augmente la quantité de l'ARNm et de la protéine FGF23 (Larsson, Nisbeth et al. 2003; Mirams, Robinson et al. 2004; Shimada, Urakawa et al. 2004; Perwad, Azam et al. 2005). De plus, l'administration de FGF23 à des souris ayant une diète riche en phosphate cause tout de même une hypophosphatémie puisque le cotransporteur NaPi de type IIa est grandement diminué (Shimada, Hasegawa et al. 2004). L'explication provient du fait que d'autres cotransporteurs NaPi peuvent être affectés par FGF23 comme par exemple le co-transporteur NaPi IIc (Bowe, Finnegan et al. 2001). Une autre étude effectuée chez des souris ayant subi une ablation génique pour le récepteur de la vitamine D montre que ces animaux sont hypophosphatémiques. Cette hypophosphatémie est causée par l'hyperparathyroïdisme résultant l'absence de récepteurs de la vitamine D. Ces souris montrent une augmentation de la quantité circulante de FGF23 lorsque ces souris sont soumises à une diète riche en phosphate (Yu, Sabbagh et al. 2005). L'augmentation des quantités de FGF23 est donc indépendante de la vitamine D.

2.2.3.4) Le métabolisme de la vitamine D chez les patients ADHR

FGF23 cause également des défauts dans le métabolisme de la vitamine D. Des études ont montré que la surexpression de FGF23 causait une diminution de la $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ concomitante avec une diminution de l'expression de l'enzyme $1-\alpha$ hydroxylase (Shimada, Mizutani et al. 2001; Shimada, Hasegawa et al. 2004). Une autre étude a montré des résultats similaires avec des injections de FGF23 soit une diminution de l'ARNm de la $1-\alpha$ hydroxylase ainsi qu'une augmentation de $24\text{-}25$ hydroxylase, une enzyme responsable de l'inactivation de la $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$. De plus, l'administration de vitamine D active ($1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$), cause une augmentation des niveaux de FGF23 suggérant une boucle de rétroaction négative (Shimada, Hasegawa et al. 2004). L'effet de FGF23 sur le métabolisme de la vitamine D est plus rapide et survient à des doses de FGF23 administrées plus faibles que l'effet observé sur le transport du phosphate, laissant suggérer que l'effet physiologique principal de FGF23 serait sur la régulation de la vitamine D (Shimada, Hasegawa et al. 2004). Afin de démontrer que la vitamine D pouvait bel et bien réguler les quantités circulantes de FGF23, un groupe a montré dans des cellules K562, qui sont des cellules de leucémie myélogénique, une augmentation de l'activité du promoteur de *Fgf23* en réponse à des doses croissantes de vitamine D, et ce, même en absence d'éléments de réponse pour la vitamine D (VDR) sur le promoteur de *Fgf23* (Ito, Sakai et al. 2005). *In vivo*, des injections de vitamine D à des rats a également augmenté les concentrations circulantes de FGF23 (Saito, Maeda et al. 2005). Finalement, des études génétiques sont arrivées à la même conclusion avec des souris chez qui le gène du récepteur de la vitamine D a été inactivé. Ces souris présentent une augmentation de FGF23, probablement en relation avec l'hypophosphatémie de ces souris (Yu, Sabbagh et al. 2005).

2.2.3.5) Le tissu osseux chez les patients ADHR

Le tissu osseux est également affecté chez ADHR, comme il l'a déjà été mentionné plus tôt. De plus, il est intéressant de noter que des souris chez qui le gène de FGF23 a été inactivé présentent une minéralisation ectopique des tissus (Razzaque, St-Arnaud et al. 2005; Lanske and Razzaque 2007). Ce phénotype est donc contraire à celui observé chez les patients ADHR. Ceci concorde avec le fait que c'est la surexpression de la forme non-clivée de FGF23 qui serait à l'origine de la maladie.

2.2.4 *L'ostéomalacie hypophosphatémique oncogénique*

L'ostéomalacie hypophosphatémique oncogénique est une maladie un peu différente des autres précédemment mentionnées à savoir que celle-ci découle de l'acquisition d'un facteur hypophosphatémique et non de l'hérédité. L'autre caractéristique principale consiste en la réversibilité de la maladie si la tumeur est enlevée par chirurgie (Carpenter 2003). De plus, en greffant la tumeur à des souris saines, on peut observer que les souris commencent à développer une hypophosphatémie peu de temps après la greffe de la tumeur et que l'hypophosphatémie disparaît lorsqu'on l'enlève. Parallèlement, l'administration de surnageant de tumeurs à des animaux sains cause le même effet, laissant supposer qu'un facteur humoral est responsable de l'hypophosphatémie engendrée par la tumeur (Cai, Hodgson et al. 1994). Ce n'est que plus tard que certaines protéines causant l'hypophosphatémie ont été identifiées. L'une de celles-ci est FGF23 (Shimada, Mizutani et al. 2001; White, Jonsson et al. 2001; Larsson, Zahradnik et al. 2003; Nelson, Bligh et al.

2003). OHO possède sensiblement les mêmes symptômes que la maladie ADHR présentée dans la section précédente à savoir des douleurs osseuses, des propensions aux fractures sans toutefois afficher de difformités aux membres (Econs and McEnery 1997). FGF23 est exprimé de façon abondante dans plusieurs tumeurs de patients et l'excision de cette tumeur fait diminuer les quantités de FGF23 dans le sérum (Yamazaki, Okazaki et al. 2002; Jonsson, Zahradnik et al. 2003; Nelson, Bligh et al. 2003).

D'autres protéines ont été proposées comme facteur phosphatémiant trouvées dans des tumeurs de patients souffrant d'ostéomalacie. Parmi celles-ci, on peut dénoter sFRP4, MEPE, un membre de la famille des SIBLINGS qui a été abordée dans une section précédente et ANK (De Beur, Finnegan et al. 2002). Dans cette section, il n'y a que leur effet sur le métabolisme du phosphate qui sera abordé.

2.2.4.1) sFRP4 comme protéine causant de l'hypophosphatémie

La protéine sFRP4 ou « secreted frizzled-related protein 4 » fait partie d'une famille de protéines sécrétées contenant un domaine riche en cystéines (Rattner, Hsieh et al. 1997) avec une grande homologie aux protéines transmembranaires de la famille Frizzled et aux récepteurs des Wnts (Leyns, Bouwmeester et al. 1997; Wang, Krinks et al. 1997). La protéine sFRP4 agit donc comme un dominant négatif lors de sa liaison avec des membres de la famille des Wnts. Les Wnts ne sont plus activés et ne peuvent plus réguler l'expression à la hausse de la β -cathénine, un régulateur positif de la minéralisation (Berndt, Craig et al. 2003). sFRP4 est exprimé de façon ubiquiste et notamment dans les os, ce qui veut dire que sFRP4 pourrait avoir un rôle autocrine ou paracrine sur les cellules osseuses (Berndt, Craig et al.

2003). Lorsque sFRP4 est administré à des rats ou lorsqu'on le surexprime dans des cellules OK, on observe une diminution de la réabsorption du phosphate (Berndt, Craig et al. 2003). Cette observation a également été vérifiée lorsque l'on administre sFRP4 à des souris saines ou ayant subi une parathyroïdectomie, ce qui indique que l'hypophosphatémie engendrée est indépendante du PTH (Berndt, Craig et al. 2003). Cette hypophosphatémie est due principalement à la diminution de la présence du cotransporteur NaPi IIa à la membrane des cellules rénales. De plus, on observe également une diminution de la β -caténine (Berndt, Bialesz et al. 2006).

2.2.4.2) MEPE comme protéine causant de l'hypophosphatémie

MEPE a également été identifié comme une protéine hautement surexprimée dans des tumeurs OHO (Rowe, de Zoysa et al. 2000). Chez l'individu normal, MEPE est exprimée principalement dans les os et dans les dents (Argiro, Desbarats et al. 2001; Lu, Huang et al. 2004; Nampei, Hashimoto et al. 2004). Comme il a été mentionné précédemment, MEPE possède un motif ASARM et c'est ce motif qui pourrait avoir un rôle à jouer dans la minéralisation. Les niveaux circulants de MEPE chez l'adulte sont d'environ 400-500 ng/ml et son expression diminue avec l'âge, et est corrélée de façon positive avec le phosphate circulant et les niveaux de PTH (Jain, Fedarko et al. 2004).

2.2.4.2.1) MEPE dans le métabolisme du phosphate

Dans des cultures de cellules rénales, MEPE a la capacité de diminuer la réabsorption du phosphate. Chez les animaux, l'injection de MEPE cause de l'hypophosphatémie et une plus grande excrétion du phosphate dans l'urine

comparativement à des animaux n'ayant pas reçu la protéine (Rowe, Kumagai et al. 2004). Cependant, des souris nues auxquelles des cellules OK surexprimant MEPE ont été injectées n'ont pas démontré une augmentation de l'excrétion du phosphate (Shimada, Mizutani et al. 2001). Ceci laisse suggérer que MEPE n'aurait pas pour rôle d'influer la réabsorption du phosphate, mais plutôt que la quantité de MEPE serait modifiée en fonction de la concentration de phosphate circulant.

2.2.4.2.2) MEPE dans le métabolisme de la vitamine D

Il a été démontré que l'injection de MEPE chez les souris cause une hypophosphatémie. Cependant, les niveaux de $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ sont augmentés contrairement à XLH ou ADHR, ce qui signifie que MEPE peut causer une hypophosphatémie, mais ne semblerait pas responsable du niveau anormalement bas de $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ (Rowe, Kumagai et al. 2004). Il a aussi été montré que l'expression de *Mepe* est diminuée par la vitamine D chez des souris *Hyp* (Argiro, Desbarats et al. 2001), comparativement aux souris sauvages. Cette observation est supportée par le fait que l'ARNm de *Mepe* est augmenté dans des souris dont le gène du récepteur de la vitamine D a été inactivé (Liu, Brown et al. 2005).

2.2.4.2.3) MEPE au niveau des cellules osseuses

Étant donné que MEPE est une protéine produite par les cellules osseuses et exprimée de façon prépondérante par les ostéocytes, plusieurs groupes ont caractérisé le rôle que peut avoir MEPE sur ces cellules osseuses. Premièrement, le fragment ASARM de MEPE est relâché grâce à l'action de la cathepsine B et il a été démontré que des mutations dans la cathepsine qui altèrent sa fonction augmentent la minéralisation dans le syndrome de Papillon-Lefevre (Toomes, James et al. 1999). Le motif ASARM, lorsqu'administré chez

la souris de façon sous-cutanée affecte négativement la minéralisation (Rowe, Kumagai et al. 2004). Des souris *Hyp*, traitées avec des inhibiteurs de la cathepsine B voient leurs défauts de minéralisation diminuer comparativement à des souris *Hyp* non traitées avec ces inhibiteurs (Rowe, Matsumoto et al. 2006). On peut donc avancer l'hypothèse que cette correction des défauts de minéralisation pourrait être due à la relâche diminuée du motif ASARM provenant de MEPE puisque non clivé par la cathepsine B. Des souris ayant subi une ablation génique pour le gène *Mepe* montrent une masse osseuse plus importante que des souris sauvages et des cultures d'ostéoblastes de souris *Mepe* *-/- ex vivo* montrent une minéralisation accrue (Gowen, Petersen et al. 2003; Liu, Brown et al. 2005). Il semblerait donc que MEPE puisse inhiber la minéralisation (Rowe, Kumagai et al. 2004). En plus du fragment ASARM de MEPE, un autre fragment de MEPE contenant le motif RGD ainsi qu'un motif d'attachement aux glycosaminoglycans aurait un effet anabolique (Hayashibara, Hiraga et al. 2004). Il est intéressant de noter aussi que cette étude montre que l'intégrité de ces deux motifs est nécessaire à l'effet osseux. Il a aussi été montré dans des cultures primaires d'ostéoblastes humains ainsi que dans des cellules ostéoblastiques de rats dérivées de la moelle osseuse que les niveaux d'ARNm de *Mepe* étaient diminués suite à un traitement par BMP-2 ou FGF2 (Siggelkow, Schmidt et al. 2004; Zhang, Mizuno et al. 2004).

Finalement, l'ablation du gène *Mepe* a été réalisée chez la souris *Hyp*. Si MEPE est important pour la régulation négative de la minéralisation chez les souris *Hyp*, l'absence de MEPE devrait rendre les souris *Hyp* normales, ce qui n'est pas le cas (Liu, Brown et al. 2005). Tous les paramètres de minéralisation de ces souris ne sont pas améliorés. Cependant, des cultures d'ostéoblastes provenant de moelle osseuse de ces souris montrent une amélioration des paramètres de minéralisation comparativement à des souris déficientes pour le gène de *Mepe* seulement (Liu, Brown et al. 2005).

3) Le transport des protéines vers la membrane plasmique

Le transport des protéines membranaires vers la membrane plasmique est hautement régulé et plusieurs étapes sont essentielles au bon fonctionnement de ce mécanisme. Dans la présente thèse, seulement les éléments nécessaires à la compréhension de celle-ci seront abordés. Brièvement le transport des protéines poursuit une route à travers différentes composantes de la voie de sécrétion. On peut noter parmi ceux-ci le réticulum endoplasmique (RE), les clusters tubulo-vésiculaires formant le compartiment ERGIC (pour ER-Golgi intermediate compartment, l'appareil de Golgi, le réseau *trans*-Golgi (TGN), les endosomes et lysosomes et la membrane plasmique (van Vliet, Thomas et al. 2003).

3.1) La membrane plasmique

La membrane plasmique est composée d'une bicouche de lipides dans laquelle sont enchâssées des protéines présentes à la surface de la cellule. C'est en 1925 que deux chercheurs allemands, Gorter et Grendel ont remarqué que les membranes isolées d'un nombre défini de globules rouges possédaient une surface deux fois plus grande que la surface des globules rouges en question, ce qui les a fait conclure que la membrane plasmique était composée d'une bicouche de lipides et non d'une couche simple. Par la suite, en 1972, Jonathan Singer et Garth Nicolson énoncent la théorie du modèle de la mosaïque fluide de la membrane plasmique. Dans ce modèle, les membranes sont perçues comme des fluides en deux dimensions dans lesquelles sont insérées les protéines. Ces deux chercheurs distinguent deux classes de protéines, les membranaires de périphérie et les membranaires intégrales. Les protéines membranaires de périphéries peuvent être dissociées de la membrane plasmique

par des traitements avec des agents polaires comme des sels. Une fois dissociées, ces protéines sont solubles dans des solutions aqueuses. Les protéines membranaires intégrales, par contre, ne peuvent être dissociées de la membrane plasmique qu'avec des molécules qui brisent les interactions hydrophobes de la bicouche de lipide. Des détergents, des molécules amphipatiques effectuent cette besogne. À l'inverse des protéines membranaires de périphérie, ces protéines ne sont pas solubles dans des solutions aqueuses. Ces protéines intégrales sont presque toutes des protéines transmembranaires qui possèdent des domaines enfouis au cœur de la membrane plasmique. C'est ce type de protéines qui sera abordé dans la section suivante.

3.2) Les protéines membranaires

Les protéines membranaires possèdent au moins un passage transmembranaire d'environ 20 acides aminés hydrophobes. Les protéines membranaires sont divisées en 5 classes distinctes qui dépendent essentiellement de leur orientation à la membrane plasmique. Les protéines de type I possèdent leur extrémité N-terminale à l'extérieur de la cellule et leur extrémité C-terminale dans le cytosol. Les protéines membranaires de type II sont à l'inverse du type I, c'est-à-dire que leur extrémité N-terminale est dans le cytosol et l'extrémité C-terminale à l'extérieur de la cellule. Par la suite, le type III est constitué de plusieurs passages transmembranaires comme par exemple le récepteur β_2 adrénergique. Ensuite, les protéines de type IV sont des protéines multimériques, c'est-à-dire qu'elles forment un canal au sein de la membrane après assemblage de leurs sous-unités. Le type V est caractérisé par

la liaison d'un lipide de façon covalente sur la chaîne polypeptidique de la protéine.

Chez les protéines membranaires, en plus du peptide signal qui engage ces protéines vers la voie de sécrétion, le passage transmembranaire composé d'acides aminés hydrophobes agit comme signal pour les diriger vers le RE. Plusieurs règles dirigent l'orientation des protéines de type I ou de type II. Les protéines étant synthétisées de l'extrémité N-terminale vers l'extrémité C-terminale, on devrait s'attendre à ce que toutes les protéines membranaires soient de type I. Cependant, des acides aminés basiques près du segment transmembranaire ou la présence d'un différentiel de charge entre les premiers acides aminés de part et d'autre de la membrane influencent l'orientation de la protéine.

3.3) Modifications des protéines dans la voie d'exocytose

Plusieurs modifications peuvent survenir dans la voie d'exocytose. On peut noter par exemple la glycosylation des protéines dans le RE et dans l'appareil de Golgi, l'ajout des ancres glycosyl-phosphatidylinositol (GPI), la formation des ponts disulfures et le clivage du peptide signal au niveau du RE.

3.3.1) Glycosylation des protéines membranaires

La N-glycosylation des protéines membranaires survient lors de sa translocation dans le RE. Un complexe oligosaccharidique de 14 résidus ($\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$) est ajouté sur les asparagines dans le contexte de la séquence consensus NXS/T où X est n'importe lequel acide aminé excepté une

proline, ce qui augmente donc la masse relative (M_r) de la protéine. Par la suite, les glucosidases I et II enlèvent deux glucoses et une mannosidase du RE enlève un résidu mannose (Kornfeld and Kornfeld 1985). Finalement, la glucosidase II enlève ensuite le dernier résidu glucose. Des chaperons moléculaires résidents du RE, comme par exemple la calnexine, la calréticuline et BiP, sont responsables du bon repliement des protéines. Ces chaperons empêchent l'agrégation des protéines lors de leur repliement en reconnaissant par exemple les sucres monoglycosylés produits précédemment. Les chaperons se dissocient des protéines en repliement lors de l'enlèvement du dernier résidu glucose. Le patron de glycosylation des protéines en sortant du RE est le suivant: $\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$. La *N*-glycosylation se poursuit dans l'appareil de Golgi. C'est à cet endroit que plusieurs enzymes sont responsables de la synthèse de sucres complexes sur les asparagines des protéines membranaires (Kornfeld and Kornfeld 1985). La *O*-glycosylation se fait dans le RE ou dans le Golgi où des résidus GalNAc sont ajoutés sur des résidus sérine ou thréonine par une N-acétylgalactosaminyl transférase (Marth 1996).

3.3.2) *Formation des ponts disulfure*

C'est aussi dans le RE pendant le repliement de la protéine que les ponts disulfures sont formés entre les différentes cystéines. Cette réaction est catalysée par des oxydoréductases. D'autres modifications peuvent survenir dans le RE comme par exemple l'hydroxylation de prolines et de lysines, l'ancrage aux membranes par des GPI et l'oligomérisation des protéines.

3.3.3) *Repliement des protéines et dégradation*

Les protéines mal repliées seront dégradées par le protéasome par un complexe appelé ERAD pour « endoplasmic reticulum-associated degradation ». Un séjour trop long dans le RE enlèvera des résidus mannose à la chaîne d'oligosaccharides ajoutés dans le RE. Cette action de la mannosidase I permettra à la protéine EDEM de reconnaître ces chaînes dépourvues d'un résidu mannose et de cibler ces protéines vers le complexe sec61. Ces protéines seront alors rétrotransloquées vers le cytosol où elles seront ubiquitinées et dégradées par le protéasome (Ellgaard and Helenius 2003).

3.4) **Les signaux de localisation cellulaire des protéines membranaires**

Il existe deux théories selon lesquelles les protéines solubles et les protéines membranaires sont empaquetées dans des vésicules. La première dite par volume, veut que les protéines soient empaquetées dans des vésicules de façon aléatoire et amenées vers les différents compartiments de la voie de sécrétion. Dans ce modèle, il est important qu'il existe des signaux de rétention et de recyclage sur les protéines. L'absence de ces signaux mène à la sécrétion. La deuxième veut qu'il existe des signaux spécifiques pour l'incorporation des protéines dans les vésicules de la voie de sécrétion afin de diriger les protéines vers les compartiments suivants. Il est maintenant connu que les deux types d'empaquetage des protéines dans les vésicules existent. De ce fait, il existe plusieurs types de signaux de localisation cellulaires. Ces signaux sont spécifiques pour la localisation aux différents compartiments de la cellule. Parmi ceux-ci, on peut dénombrer les signaux de rétention au RE, les signaux d'export du RE, les signaux de localisation à l'appareil de Golgi, les signaux de localisation au réseau *trans*-Golgi, les signaux de ciblage vers les lysosomes,

les signaux de ciblage vers les endosomes et le transport à la membrane plasmique. Un résumé de ces signaux de localisation sera abordé dans le

Tableau IV : Signaux et motifs de localisation cellulaire. La figure 11 : Export des protéines vers les différents compartiments cellulaires résume quant à elle de façon schématique l'export des protéines membranaires à partir du RE. Dans cette section, il n'y a que les signaux de rétention et d'export du RE, ainsi que les signaux de transport vers la membrane plasmique qui seront abordés.

Tableau IV : Signaux et motifs de localisation cellulaire

Signal	Signature du signal	Rôle sur la localisation	Référence
KDEL	KDEL	Rétention au RE	(Munro and Pelham 1987)
di-lysine	KKXX	Rétention au RE	(Letourneur, Gaynor et al. 1994)
δ -L		Rétention au RE	(Cosson, Lefkir et al. 1998)
	RKR	Rétention au RE	(Schutze, Peterson et al. 1994)
di-phénylalanine		Rétention au RE	(Fiedler, Veit et al. 1996)
domaine transmembranaire		Rétention au RE	(Sato, Sato et al. 1996)
domaine cytosolique		Rétention au RE	(Sato, Sato et al. 1996)
di-acide	(D/E)X(D/E)	Export du RE	(Nishimura and Balch 1997; Nishimura,

Signal	Signature du signal	Rôle sur la localisation	Référence
			Bannykh et al. 1999)
di-hydrophobique di-leucine	LL	Export du RE	(Otte and Barlowe 2002)
di-hydrophobique di-phénylalanine	FF	Export du RE	(Dominguez, Dejgaard et al. 1998)
di-hydrophobique di-tyrosine	YY	Export du RE	(Sato and Nakano 2002)
di-hydrophobique phénylalanine-tyrosine	FY	Export du RE	(Contreras, Yang et al. 2004)
di-basique	(R/K)X(R/K)	Export du RE	(Giraudo and Maccioni 2003)
	SDYQRL	Réseau <i>trans</i> -Golgi	(Bos, Wraight et al. 1993)
domaine cytoplasmique		Réseau <i>trans</i> -Golgi	(Ponnambalam, Rabouille et al. 1994)
	YKGL	Réseau <i>trans</i> -Golgi	(Jones, Thomas et al. 1995)
région riche en acides aminés acides		Réseau <i>trans</i> -Golgi	(Takahashi, Nakagawa et al. 1995)
di-leucine :	LL	Réseau <i>trans</i> -Golgi	(Francis, Jones et al. 1999)
domaine cytosolique		Réseau <i>trans</i> -Golgi	(Gleeson 1998; Francis, Jones et al. 1999)

Signal	Signature du signal	Rôle sur la localisation	Référence
sucres N-glycans			(Hille-Rehfeld 1995)
motifs à tyrosines	YXXΦ	Endosomes	(Boll, Rapoport et al. 2002)
motifs à tyrosines	FxNPxY	Endosomes	(Boll, Rapoport et al. 2002)
motifs à leucine	(DE)xxxLL(I)s	Endosomes	(Bonifacino and Traub 2003)
motifs à leucine	LL	Endosomes	(Cailler, Zappulla et al. 1999)
sucres N-Glycans		membrane apicale	(Scheiffele, Peranen et al. 1995)
motif tyrosine	YXXΦ	membrane basolatérale	(Folsch, Ohno et al. 1999)
di-leucine	LL	membrane basolatérale	(Vaingankar, Fitzpatrick et al. 2004)

3.4.1) Signaux de rétention au RE

L'identification des signaux de rétention et d'export du RE est une avancée relativement récente du domaine scientifique. L'export du RE vers l'appareil de Golgi se fait à l'aide de deux types de vésicules de transport. Ces deux types de vésicules possèdent plusieurs sous-unités appelées COPs. Ces vésicules peuvent bourgeonner des sites d'export du RER (Orci, Ravazzola et al. 1991) ou du Golgi. Il est important de noter que ce transport vésiculaire est

dynamique entre le RER et l'appareil de Golgi (Ward, Polishchuk et al. 2001). Les vésicules responsables du transport antérograde du RER vers le compartiment ERGIC et à l'appareil de Golgi s'appellent COPII (Scales, Pepperkok et al. 1997) tandis que les vésicules responsables du transport rétrograde s'appellent COPI (Lippincott-Schwartz, Cole et al. 1998).

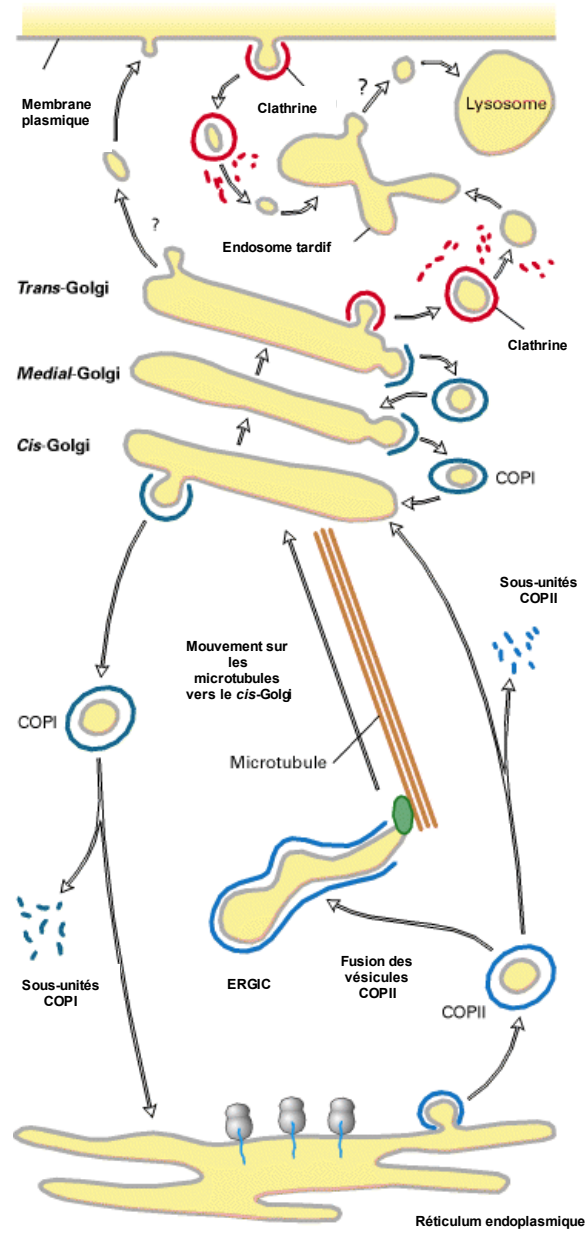
De tous les signaux de rétention, le signal le plus utilisé par les protéines est sans contredit la séquence KDEL (Munro and Pelham 1987). Les protéines qui possèdent cette séquence en acides aminés sont reconnues par les récepteurs KDEL au niveau de l'appareil de Golgi et se recyclent alors vers le RE. Des protéines non résidentes du RE auxquelles on ajoute cette séquence se recyclent au RE (Munro and Pelham 1987).

Un autre signal de rétention pour les protéines membranaires de type I est le motif dilysine (KKXX) qui interagit avec les composantes des vésicules de type COPI qui retournent alors ces protéines vers le RE (Letourneur, Gaynor et al. 1994; Gaynor and Emr 1997). Fait intéressant, la protéine 14-3-3 pourrait promouvoir l'export des protéines contenant un motif dibasique en masquant ce signal. L'absence d'interaction entre les protéines masquées par la protéine 14-3-3 et les vésicules COPI favoriserait donc l'export de celles-ci du RE (O'Kelly, Butler et al. 2002). Un autre motif de rétention au RE est le motif diphenylalanine qui, par interaction avec les sous-unités des vésicules de type COPI, renvoie les protéines ayant ce motif du compartiment ERGIC vers le RE (Fiedler, Veit et al. 1996). Finalement, un dernier motif, appelé δ -L, interagit avec la sous-unité δ de COPI et confère une localisation au RE à la protéine qui le porte (Cosson, Lefkir et al. 1998).

Un autre signal est le motif RKR. Ce motif permet la rétention dans le RE des protéines membranaires de type II qui sont destinées à l'export, le temps que leur maturation soit complète. Le motif est alors masqué par

l'assemblage des différentes sous-unités de la protéine en cours de synthèse. Ce motif a été identifié chez la protéine Iip et la sous-unité sensible à l'ATP des canaux potassiques (Schutze, Peterson et al. 1994; Zerangue, Schwappach et al. 1999).

A



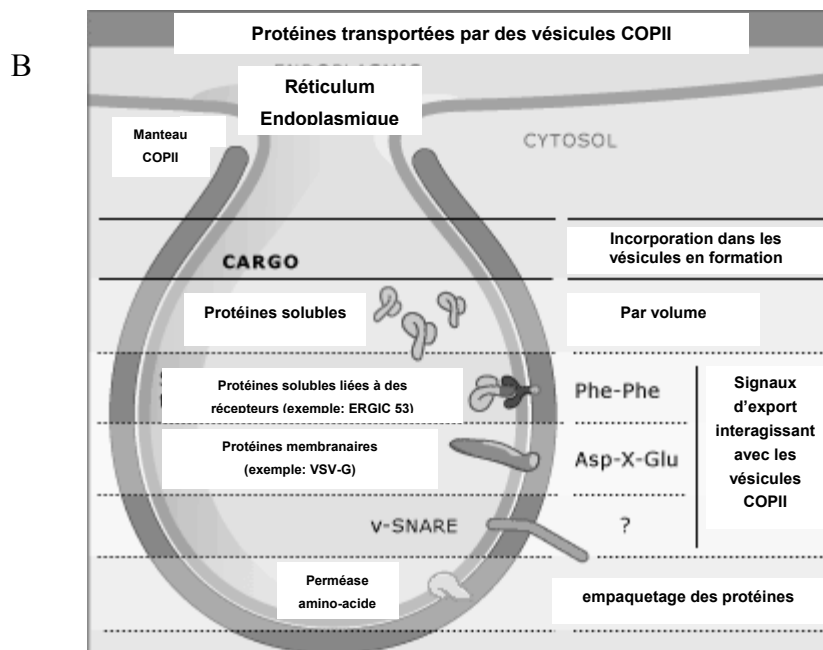


Figure 11 : Export des protéines vers les différents compartiments cellulaires (www.ergito.com).

Nous pouvons observer le transport rétrograde effectué par les vésicules COPI en A) et des exemples de sélection des protéines dans les vésicules cargo comme les vésicules COPII en B). Notez les motifs di phénylalanine responsable du transport des protéines solubles et les motifs di-acides responsables quant à eux du transport des protéines membranaires comme par exemple VSV-G.

Un groupe de recherche a également observé que le domaine transmembranaire pouvait servir de signal de rétention au RE chez la protéine Sec12p de la levure tandis que le domaine cytoplasmique sert également de signal de rétention au RE via l'interaction avec Rer1p, une protéine résidente du *cis*-Golgi (Sato, Sato et al. 1996).

3.4.2) Signaux d'export du RE

Les premiers signaux d'exports du réticulum répertoriés sont les motifs di-acides. En effet, le motif YTDIEM a été montré comme important pour l'export de la protéine VSV-G (Nishimura and Balch 1997; Nishimura, Bannykh et al. 1999; Sevier, Weisz et al. 2000). Ce signal est présent dans la queue cytosolique de cette protéine. D'autres protéines possèdent aussi ce type de signal comme par exemple le canal potassique entrant, le canal chlore CFTR (cystic fibrosis transmembrane conductance regulator), le canal potassique TASK-3, le récepteur à vasopressine V1b/V3, la protéine de levure sys1p ainsi que la protéine PRA (prenylated Rab acceptor) (Abdul-Ghani, Gougeon et al. 2001; Votsmeier and Gallwitz 2001; Robert, Auzan et al. 2005; Robert, Clauser et al. 2005; Zuzarte, Rinne et al. 2007). Il a été montré que l'introduction dans des cellules en cultures de la lignée MDCK de peptides contenant le motif di-acide permet de compétitionner avec des protéines possédant ces motifs d'export du RE. L'ajout de ce peptide a empêché la protéine VSV-G de passer du RE au Golgi et à la membrane basolatérale de cellules MDCK (Soza, Norambuena et al. 2004). Ceci constitue donc un outil intéressant pour l'étude du transport des protéines possédant des motifs de rétention ou d'export du RE par exemple.

Un autre motif responsable de l'export du RE est le motif dihydrophobique. Ce motif peut prendre quelques formes différentes comme par exemple di-leucine (LL), di-phénylalanine (FF), di-tyrosine (YY) ou phénylalanine-tyrosine (FY). Ce motif interagit avec les vésicules COPII et favorise la sortie du RE. C'est le cas notamment pour la famille de protéines p24 et de la protéine ERGIC-53 qui possède un motif FF (Dominguez, Dejgaard et al. 1998; Nufer, Kappeler et al. 2003). Des mutations dans ce motif empêchent la sortie du RE.

Du côté des autres signaux, on peut noter que le motif di-leucine est répertorié chez les protéines de levure Erv41p et Erv46p (Otte and Barlowe 2002) et le motif di-tyrosine chez les protéines de la levure Emp46p et Emp47p (Sato and Nakano 2002). Finalement, le motif YF est important pour la liaison au dimère Sec23/Sec24 pour la protéine p24 chez la plante (Contreras, Yang et al. 2004).

Tous ces motifs lient le complexe Sec23-Sec24 ou un de ses homologues répertoriés tant chez la levure que chez les mammifères (Roberg, Crotwell et al. 1999; Tang, Kausalya et al. 1999; Kurihara, Hamamoto et al. 2000). Il a été montré que plusieurs sites d'interaction différents entre ces motifs et le complexe Sec23-Sec24 (Miller, Beilharz et al. 2003; Mossessova, Bickford et al. 2003; Mossessova, Corpina et al. 2003). On peut donc supposer qu'il existe plusieurs sous-types de cargo COPII.

Un autre signal d'export est le motif dibasique (RK)X(RK) qui interagit plutôt avec Sar1 pour le transport dans les vésicules COPII. Ce motif est présent sur les glycosyltransférases, protéines résidentes de l'appareil de Golgi, responsables de la glycosylation des protéines sécrétées (Giraudou and Maccioni 2003).

Certaines protéines importantes pour la fusion des vésicules avec les membranes acceptrices les v-SNARES (vesicle- soluble NSF attachment receptor) sont aussi incorporées de façon spécifique dans des vésicules COPII via l'interaction avec le complexe Sec23-Sec24 (Matsuoka, Morimitsu et al. 1998; Spang, Matsuoka et al. 1998). Cette liaison avec les v-SNARES se ferait à des sites différents des sites de liaison aux motifs di-acides. Cependant, il a été montré que la liaison à Sec23-Sec24 par les protéines contenant des motifs di-acide change la conformation du complexe et empêche la liaison à certains v-

SNARES (Miller, Beilharz et al. 2003; Mossessova, Bickford et al. 2003; Mossessova, Corpina et al. 2003). On peut donc supposer que les molécules d'attachement aux membranes sont choisies de façon sélective avec les protéines cargo correspondantes afin de les amener vers des régions membranaires précises.

3.4.2.1) Les vésicules COPII

Le complexe COPII est composé de la GTPase Sar1 et des hétérodimères Sec23/Sec24 et Sec13/Sec31. La formation des vésicules COPII se fait de façon séquentielle. Tout d'abord, c'est la GTPase Sar1 qui est activée sous sa forme liée au GTP par Sec12, localisée à la membrane du RE, qui déclenche le recrutement des autres constituants du complexe (Lee, Miller et al. 2004; Gurkan, Stagg et al. 2006). Les vésicules COPII bourgeonnent des sites de sortie du RE et amènent leur contenu au ERGIC. Il est intéressant de noter que le dimère Sec23-Sec24 possède des sites de reconnaissance pour l'inclusion de protéines de façon spécifique à l'intérieur de vésicules de type COPII. De plus, Sar1 pourrait aussi jouer un rôle dans la sélection des protéines à l'intérieur des vésicules en liant des signaux d'export du RE (Miller, Antonny et al. 2002; Miller, Beilharz et al. 2003). Les vésicules sont présentées à la figure 11.

3.4.2.2) Les vésicules COPI

Comme mentionné précédemment, les vésicules COPI sont responsables du transport rétrograde. Toutefois, ces vésicules effectuent également un transport antérograde entre le compartiment ERGIC et les cisternes du Golgi.

Le complexe COPI est heptamérique en plus de la petite GTPase Arf1 (Serafini, Stenbeck et al. 1991; Waters, Serafini et al. 1991). Il contient les protéines COP α , β , γ , ζ , δ , β' et ϵ (Bethune, Wieland et al. 2006). La formation des vésicules COP est complexe et requière Arf1 sous sa forme liant le GTP (Derby and Gleeson 2007). Les vésicules COPI pourraient également se former au TGN, ce qui ferait en sorte que ces vésicules puissent effectuer le transport rétrograde à travers tout l'appareil de Golgi (Simon, Ivanov et al. 2000). Finalement, il a également été montré que les vésicules COPI pourraient effectuer le transport antérograde du TGN vers la membrane plasmique (Hu, Kao et al. 1999; Simon, Ivanov et al. 2000) bien que l'exactitude de ce type de transport soit discutée et controversée. Un aperçu de la fonction des vésicules de type COPI est présenté à la figure 11.

3.4.3) Transport à la membrane plasmique

Le transport à la membrane plasmique dans des domaines membranaires précis est un déterminant de la polarité des cellules épithéliales. Certains signaux amenant les protéines à la membrane apicale ou basolatérale ont été identifiés. Il semblerait que les signaux transportant les protéines membranaires à la membrane basolatérale ont un effet dominant sur les signaux transportant les protéines vers la membrane apicale et que c'est l'absence de signaux de localisation vers la membrane basolatérale qui dirigerait les protéines membranaires vers la membrane apicale.

3.4.3.1) Transport à la membrane apicale

Le transport à la membrane apicale des cellules polarisées est spécifique à quelques facteurs. Premièrement, il a été remarqué que l'ajout de sucres N-glycan peut agir comme signal de transport à la membrane apicale. Par exemple, il a été montré que dans des cellules MDCK, il était possible de diriger l'hormone de croissance exclusivement vers la membrane apicale lorsque celle-ci était glycosylée. Habituellement, cette hormone ne l'est pas et est dirigée à la fois à la membrane apicale et à la membrane basolatérale (Scheiffele, Peranen et al. 1995). La présence de certains lipides enchâssés dans la membrane plasmique pourrait également être importante pour la localisation à la membrane apicale. En effet, les radeaux lipidiques sont plus présents à la membrane apicale et les protéines possédant des ancres GPI se retrouveraient donc à cette surface de la cellule (Brown and Rose 1992). Les N- ou O-glycans pourraient également servir comme signal de localisation par une interaction avec les lectines du TGN qui vont à la membrane apicale (Fiedler, Parton et al. 1994).

3.4.3.2 Transport à la membrane basolatérale

Les signaux de transport à la membrane basolatérale incluent un motif tyrosine YXXΦ. Dans les cellules épithéliales, ce motif interagit avec la sous-unité de AP1 (Folsch, Ohno et al. 1999). Ce motif a été retrouvé chez la transferrine et le récepteur aux lipoprotéines à faible densité (Futter, Gibson et al. 1998; Folsch, Pypaert et al. 2001). Un autre signal de transport au côté basolatéral est un motif di-leucine. Ce motif di-leucine est important pour le transport spécifique de la protéine ENPP1 vers les vésicules de calcification des ostéoblastes. Des mutations du motif di-leucine fait en sorte qu'une diminution

de l'incorporation de ENPP1 dans les vésicules de calcification est observée (Vaingankar, Fitzpatrick et al. 2004). De plus, un motif di-leucine peut transporter la E-cadhérine vers la membrane basolatérale dans des cellules MDCK (Miranda, Khromykh et al. 2001).

II) Objectifs de recherche

Les études à ce jour sur PHEX n'ont pas encore permis d'élucider comment des mutations de PHEX causent l'hypophosphatémie liée au chromosome X. Ceci nous a incité à entreprendre une étude visant à 1) mieux comprendre le rôle de PHEX au niveau cellulaire et 2) mieux connaître les mécanismes de la pathophysiologie de XLH.

Dans un premier temps, une étude de la régulation du gène de PHEX a été effectuée. PHEX étant importante pour la régulation de la réabsorption du phosphate, nous avons voulu déterminer de quelle façon l'expression de PHEX pouvait être régulée au niveau cellulaire. Il a donc été découvert que l'expression de PHEX diminuait suite à l'exposition à des concentrations physiologiques de PTHrP. Cette régulation passe par la voie de l'AMPc/PKA. De plus, ce serait cette voie qui serait utilisée de façon prioritaire sur la voie de la PKC, pouvant également réguler PHEX à la hausse. L'ensemble de ces travaux est présenté dans le deuxième chapitre de cette thèse (Vargas, St-Louis et al. 2003).

Suite à l'étude de la régulation, nous avons voulu déterminer, à l'aide de mutants de PHEX, l'importance du profil d'expression cellulaire de PHEX. Un des mutants choisis, où le quatrième acide aminé, un acide glutamique, est changé pour une glutamine, n'est plus incorporé dans les vésicules de

calcification. Cette étude démontre que cet acide aminé modifie un domaine di-acide présent dans la queue cytosolique de PHEX. Ce motif di-acide est essentiel pour l'incorporation de PHEX dans les vésicules de calcification. De plus, il a été démontré que la présence de PHEX dans les vésicules de calcification influence la minéralisation d'ostéoblastes en culture. Ces travaux sont présentés dans le troisième chapitre de cette thèse.

Ensuite, nous nous sommes intéressé, à FGF23, une protéine dont l'expression est augmentée chez les souris *Hyp*, par un mécanisme encore inconnu. Nous avons donc évalué la surexpression de PHEX dans des ostéoblastes murins, des cellules de la lignée MC3T3. Cette surexpression cause une différenciation accélérée des ostéoblastes, démontrée par une augmentation plus rapide de l'activité de la phosphatase alcaline et de la minéralisation par un marquage au rouge alizarin. Des études de RT-PCR visaient à voir si la différenciation, la prolifération ou la sénescence pouvaient être affectées lors de la surexpression de FGF23. Cette étude a démontré que les cellules MC3T3 surexprimant FGF23 démontraient un profil de sénescence augmenté. Le phénotype de XLH pourrait donc être dû à la sénescence prématurée des ostéoblastes. Ces travaux sont présentés dans le quatrième chapitre de cette thèse.

Chapitre 2 – Article: Parathyroid Hormone-Related Protein(1-34) Regulates Phex Expression in Osteoblasts Through the Protein Kinase A Pathway.

Mise en contexte

PHEX est une protéine importante pour la minéralisation. Des mutations ou l'ablation du gène de *Phex* chez la souris résultent en des défauts de minéralisation. La régulation de l'expression de la protéine PHEX pourrait avoir un rôle important dans le processus de minéralisation. Peu d'études traitent de ce phénomène.

La présente étude permet de mettre en évidence que la protéine PHEX est régulée négativement par le PTHrP (1-34), pouvant agir de façon autocrine sur les cellules. De plus, il a été montré que cette régulation passe par la voie de la protéine kinase A dans les cellules UMR-106 et que cette régulation se fait aussi dans des cultures primaires de calvarias de rat.

Cet article a été publié en 2003 dans la revue *Endocrinology* aux pages 4876-4885.

Note : Contribution(s) des auteurs

MAV : Culture cellulaire et traitements utilisant les différentes drogues de l'étude, traitements utilisant les différents fragments de PTH et PTHrP, RT-PCR participation à l'écriture du manuscrit.

MSL : Culture cellulaire et traitements des cellules UMR-106 avec les différentes drogues de l'étude, immunobuvardages, cultures primaires des *calvarias* de rat, fractionnement cellulaire sur les différents isoformes de la PKC, essais d'accumulation d'AMPc, participation à l'écriture du manuscrit.

LDG : Participation à l'écriture du manuscrit

JLC : Participation à l'écriture du manuscrit

GB : Supervision générale et écriture du manuscrit

Parathyroid Hormone-Related Protein(1-34) Regulates Phex Expression in Osteoblasts Through the Protein Kinase A Pathway.

MIGUEL ÁNGEL VARGAS,^{1,2} MATHIEU ST-LOUIS,¹ LUC
DESGROSEILLERS,¹ JEAN-LOUIS CHARLI,² and GUY BOILEAU¹

¹Département de Biochimie, Faculté de Médecine, Université de Montréal,
Montréal, Québec, Canada.

²Departamento de Genética del Desarrollo y Fisiología Molecular, Instituto de
Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Cuernavaca, Mor.
México

Running title: Regulation of Phex expression by PTHrP(1-34).

Correspondence should be addressed to: Guy Boileau, Département de
Biochimie, Faculté de Médecine, Université de Montreal, C.P. 6128, Succ.
Centre-Ville Montréal, Qc, Canada H3C 3J7. Telephone number: (514) 343-
6328; fax number: (514) 343-2210.

Key words: Phex, PTHrP(1-34), PKA, osteoblast.

Supported by grants # NRF13052 from Canadian Institutes of Health Research
and # ER-73358 From Fonds pour la formation des chercheurs et l'aide à la
recherche (FCAR).

ABSTRACT

Phex (a phosphate-regulating gene with homologies to endopeptidases on the X chromosome) is expressed predominantly in bone where it has been implicated in the mineralization process. Multiple factors and hormones, including parathyroid hormone-related protein (PTHrP) regulate formation, development and/or homeostasis of bone. The purpose of the present study was to determine whether PTHrP(1-34) regulates Phex expression and to identify the signaling pathway used. Phex mRNA and protein levels were analyzed by reverse transcriptase-polymerase chain reaction and immunoblotting, respectively. In UMR-106 cells, PTHrP(1-34) caused a time- and concentration-dependent decrease in Phex expression. Forskolin, an adenylate cyclase activator, had the same effect. Dibutiryl cAMP also decreased Phex expression and its effect was blocked by H89, a protein kinase A (PKA) inhibitor. In contrast, TPA, a protein kinase C (PKC) activator, increased Phex expression in a time- and dose-dependent manner. This effect was reversed by bisindolylmaleimide I, a PKC inhibitor. Bovine PTH(3-34), that activates PKC but not PKA, had no effect. On the contrary, human PTH(1-31), that activates PKA but not PKC, decreased Phex expression. H89 but not bisindolylmaleimide I blocked the effect of PTHrP(1-34). PTHrP(1-34) also decreased Phex expression in cultures of fetal rat calvaria cells at day 7 of culture but not at later stages. These data demonstrate that PTHrP(1-34), through PKA, down-regulates Phex expression in osteoblasts.

Key words: Phex, PTHrP(1-34), PKA.

INTRODUCTION

PHEX (formerly *PEX*; a phosphate-regulating gene with homologies to endopeptidases on the X chromosome) was identified by positional cloning as the gene responsible for X-linked hypophosphatemia (XLH) in humans (1). XLH is a mendelian disorder of phosphate homeostasis characterized by growth retardation, renal defects in vitamin D metabolism, hypophosphatemia resulting from decreased phosphate reabsorption in the renal proximal tubules and defective mineralization of teeth and bones causing rachitic and osteomalacic bone disease (2). Much of our actual understanding of the pathophysiology of XLH has been obtained using a murine model for human XLH, the *Hyp* mouse, which presents a large deletion in the 3' region of the *Phex* gene (*PHEX* and *Phex* refer to the human and mouse genes respectively) (3), and phenotypic features similar to those of XLH patients (4). The defective renal phosphate transport in *Hyp* mice has been attributed to decreased renal proximal tubule expression of the type I and II sodium-dependent phosphate co-transporter genes and proteins (5,6). Parabiosis experiments and cross-kidney transplantation between *Hyp* and normal mice (7,8) suggested the presence of a circulatory phosphaturic hormone, designated phosphatonin (9) responsible for renal phosphate wasting. In accordance with this hypothesis, two groups have reported the presence of a renal phosphate transport inhibitory activity in conditioned medium of cultured osteoblasts isolated from *Hyp* mice (10,11). Although the exact nature of phosphatonin remains to be determined, several candidates have been proposed (for a review see 12) including FGF 23 (13), MEPE (matrix extracellular phosphoglycoprotein) (14) and FRP-4 (*Frizzled*-related protein 4) (15).

Human and mouse *PHEX/Phex* cDNAs have been cloned and sequenced (3,16-20). Amino acid sequence comparisons have demonstrated homologies between *PHEX/Phex* protein and members of the M13 zinc metalloendopeptidase family. The peptidases of this family are type II integral membrane glycoproteins with a relatively short N-terminal

intracellular region, a single transmembrane domain, and a large extracellular domain, which contains the active site of the enzyme (21). Peptidases of the M13 family have been shown to regulate the activity of biologically active peptides either by degradation of active peptides (neprilysin: NEP, neutral endopeptidase 24.11) (22) or in processing inactive peptide precursors into active forms (endothelin-converting enzymes 1 and 2; ECE-1 and ECE-2) (23).

Several studies support a role of PHEX/Phex in mineralization. PHEX/Phex mRNA and protein are localized predominantly in bone and teeth, specifically in osteoblasts, osteocytes and odontoblasts but not in preosteoblasts (3,16,19,24-26). In developing bones *in vivo* or during osteoblast differentiation *in vitro*, Phex mRNA and protein expression is temporally associated with the mineralization process (19,24-27). Finally, studies *in vivo* and *in vitro* have shown that the loss of Phex function in osteoblasts causes an intrinsic defect in the mineralization process (28-31). However, the mechanism by which mutations in the PHEX/Phex gene cause renal phosphate wasting and impaired bone mineralization in XLH patients and *Hyp* mice is not known. Based on the sequence homology of PHEX/Phex to members of the M13 family it has been postulated that PHEX/Phex inactivates phosphatonin.

Although it is well documented that PHEX/Phex is involved in regulating phosphate homeostasis and bone mineralization, little information is available concerning the regulation of PHEX/Phex expression. Recently it has been reported that Phex expression is down-regulated *in vitro* by vitamin D3 in primary osteoblasts derived from calvaria and in MC3T3 cells, and up-regulated by glucocorticoids in UMR-106 cells (27,32). *In vivo*, Phex mRNA levels are up-regulated by glucocorticoids in calvaria and by insulin-like growth factor and growth hormone in calvaria and lungs (32-34). The present study was undertaken to determine whether parathyroid hormone-related protein (1-34) (PTHrP(1-34)) can regulate Phex expression and to identify elements of the signaling pathway used by this hormone in

UMR-106 (35) cells and fetal rat calvaria cells. PTHrP(1-34) is an hormone synthesized by osteoblasts, acting auto- or paracrinally and involved in the development of bones (36,37). Using semi-quantitative reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR) and immunoblotting to determine Phex mRNA and protein levels, respectively, we show that PTHrP(1-34), through the protein kinase A (PKA) pathway, down-regulates Phex expression.

MATERIALS AND METHODS

Reagents

Bisindolylmaleimide I, 12-O-tetradecanoyl phorbol-13-acetate (TPA), 4 α -phorbol 12,13-didecanoate (4 α -PDD), forskolin, N⁶,2'-O-dibutiryladenosine-3':5'-cyclic monophosphate ((Bu)₂cAMP), N-[2-(p-bromocinnamylamino)ethyl]-5-isoquinolinesulfonamide dihydrochloride (H89) and 1,9-dideoxyforskolin were obtained from Sigma (St Louis, MO, USA). Parathyroid hormone-related protein(1-34) (PTHrP(1-34)) and PTHrP(107-111), rat, bovine and human PTH(1-34) (rPTH, bPTH and hPTH, respectively), bPTH (3-34) and hPTH (1-31) were purchased from Peninsula Laboratories (Belmont, CA, USA) or Bachem (Torrance, CA, USA).

Culture of UMR-106 cells and treatments

Stock cultures of UMR-106 cells (American Type Culture Collection, Manassas, VA, USA) were maintained in Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) (Life Technologies, Burlington, Ontario, Canada) supplemented with 10 % fetal bovine serum (FBS), glucose (4.5 g/l), penicillin (50 U/ml), streptomycin (50 μ g/ml), fungizone (125 ng/ml), glutamine (2 mM) and sodium pyruvate (1 mM) in a water-saturated atmosphere of 95% N₂ and O₂ and 5% CO₂ at 37 °C. Cells were passaged every 3-4 days when reaching confluence and were not used beyond passage 17.

To study the regulation of Phex expression, 2x10⁵ cells were plated in 60 mm tissue culture dishes in 2 ml DMEM supplemented as indicated above; the medium was changed every two days. At day 4 of culture, when cells

reached confluence, medium was replaced with DMEM (phenol red free) supplemented as indicated above except that FBS was substituted for 10 % stripped FBS. After 24 h the medium was replaced by fresh one and cells were incubated with agents at indicated doses and times. Finally, cells were washed twice with PBS and kept at -80°C or immediately processed for RNA or protein extraction.

TPA (10^{-2} M), 4α -PDD (10^{-2} M), bisindolylmaleimide I (10^{-3} M), forskolin (10^{-2} M), 1,9-dideoxyforskolin (10^{-2} M) and H89 (10^{-2} M) were dissolved in dimethylsulfoxide (DMSO); (Bu) $_2$ cAMP (10^{-1} M), hormones and peptides (10^{-4} M) in water. Stock solutions of drugs were diluted with culture medium to appropriate concentration just before addition to cultures. DMSO had no effect on Phex mRNA levels. Inhibitors were added 1h before agents.

Culture of fetal rat calvaria cells and treatments

Cells were enzymatically isolated from the calvaria of 21-d Wistar rat fetuses as described by Bonnelye et al. (38). Isolated cells were plated on 12 well plates at a density of 10^4 cells/well. After 24 h incubation, the medium was changed and supplemented with 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ascorbic acid, 10mM sodium β -glycerophosphate and 10^{-8} M dexamethasone. Medium was changed every 2 or 3 days and the cells were maintained in a water saturated atmosphere of 95% O_2 and 5% CO_2 at 37°C . Cells were treated with PTHrP(1-34) (10^{-7} M), forskolin (10^{-6} M) or TPA (10^{-8} M), or vehicle alone at days 7, 12, 16, 19 and 22. Medium was changed prior to drug treatments and cells were then incubated with drugs for 16 hours. Cells were then washed twice with PBS and processed for RNA extraction.

RNA extraction

Total RNA was isolated using the RNeasy kit (QIAGEN, Mississauga, ON, Canada) according to manufacturer's instructions. RNA was digested with RNase-free DNase (QIAGEN) to remove possible contaminating genomic DNA. RNA concentration was determined by absorbance at 260 nm; RNA yields were similar among treatments and reproducible (80-100 µg total RNA per dish). Only RNA samples with a 260/280 nm absorbance ratio >1.6 were used in RT-PCR.

Phex and NEP mRNA semi-quantification by RT-PCR

Changes in Phex or NEP mRNA levels were determined by semi-quantitative RT-PCR. Total RNA (0.26 µg) was reverse transcribed and cDNA amplified by PCR using the One-Step RT-PCR kit (QIAGEN) as recommended by the manufacturer, in presence of a recombinant RNase inhibitor (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). The housekeeping genes β -actin or glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (G3PDH) were used as internal controls. For cDNA amplification we used the following sets of specific primers (custom synthesized by Life Technologies, Burlington, Ontario, Canada): 5'-CCATGTACGTAGCCATCCAG-3' and 5'-GCACGATTTCCCTCTCAGCTGT-3' sense/antisense strands, amplifying bases 2186-2422 of the rat β -actin cDNA (accession number V01217); 5'-AAACCCATCACCATCTTCCAGG-3' and 5'-ACCACCCTGTTGCTGTAGCC-3' sense/antisense strands, amplifying bases 238-998 of the rat G3PDH cDNA (accession number M17701); 5'-GGATTGGCTATCCTGATGAC-3' and 5'-CCTAGTGTGTTAATTCCA-3' sense/antisense strands, amplifying bases 1514-2015 of the rat NEP cDNA (accession number M15944); 5'-CCTGAAGGGGTTTGGTCAGAGAGA-3' and 5'-

GTCCCCTGGATTACCCTTGAGAA-3' sense/antisense strands, amplifying bases 1007-1668 of the rat Phex cDNA (accession number AJ001637). Because initial experiments showed that the linear amplification range for each product (β -actin, G3PDH, NEP and Phex) occurred in different cycle ranges, cDNAs were amplified at the same time in different tubes. After initial denaturation at 95 °C for 15 min, 20 or 27 cycles were carried out to amplify β -actin/G3PDH or Phex/NEP cDNAs, respectively. Each cycle consisted of denaturation, annealing and extension steps of 1 min at 94 °C, 1 min at 58 °C and 1 min at 72 °C, respectively, followed by a final extension step at 72 °C for 10 min. RT-PCR was performed in a Peltier thermal cycler (MJ Research, Inc., Boston, MA, USA). The PCR products were separated by electrophoresis on 1% agarose gels, and stained with ethidium bromide to visualize and quantify the bands by computerized densitometric scanning using the ChemicDoc System and the Quantity One software (Bio-Rad, CA, USA). As expected, PCR amplification yielded products with sizes consistent with 237, 761, 502 and 662 bp products for β -actin, G3PDH, NEP and Phex respectively. Phex or NEP RT-PCR product densitometric values were normalized against those corresponding to β -actin or G3PDH products. The intensity of β -actin or G3PDH PCR products per μ g total RNA did not change significantly between the treatments. Two negative controls, samples without RT reaction or without RNA, were usually included; in these conditions no products were visualized, eliminating genomic DNA or laboratory contaminations.

Phex protein extraction and immunoblotting

After treatments, UMR-106 cells were washed twice with PBS and resuspended by scrapping in 0.5ml PBS containing 1% n-octylglucoside. The cell suspension was incubated at 4°C for 4 h on a rotating wheel and finally centrifuged at 13 000 rpm for 30 min at 4°C. The supernatant was

concentrated 15 times using Microcon Centrifugal Devices (Millipore, Bedford, MA, U.S.A.). Quantitation was made using the DC protein assay kit (Biorad, Mississauga, ON, Canada). For protein analysis, 50 µg of protein were resolved by SDS-PAGE on a 7,5% gel, transferred to a nitrocellulose membrane and immunodetected with the 13B12 anti PHEX monoclonal antibody (25; BioMep, Montreal, QC, Canada). The protein/antibody complex was revealed by chemiluminescence using the Western lightning kit (Perkin Elmer Life Sciences, Boston, MA, U.S.A.).

cAMP accumulation assays.

UMR-106 cells were grown in DMEM in 100 mm petri dishes. Before treatments, the cells were starved in serum free media and labeled overnight (16 h) with 1 µCi/ml of [³H]adenine. Radioactive medium was then replaced with fresh DMEM, and the cells were mechanically detached and thoroughly washed (three times) with PBS (4°C). Viability was assessed using trypan blue. Then, 5×10^5 cells were resuspended in 300 µl of assay mixture containing PBS and the different drugs at the indicated concentrations, and incubated for 20 min at 37°C. The assay was terminated by the addition of 600 µl of a ice-cold solution containing 5% trichloroacetic acid, 5 mM ATP, and 5 mM cAMP. [³H]ATP and [³H]cAMP were separated by sequential chromatography on Dowex exchange resin and aluminum oxide (39). Results were expressed as the ratio of [³H]cAMP/[³H]ATP + [³H]cAMP.

PKC activation

Cultures of UMR-106 cells were starved in serum free medium for 20 h and incubated in the absence or the presence of 10^{-7} M PTHrP(1-34) or 10^{-8} M TPA for 30 min in the same medium containing 0.1% BSA. Subcellular fractions were prepared as previously described with minor modifications

(40). Cells were washed with cold PBS and scraped from the plates on ice in 750 μ l of buffer A [50 mM Tris-HCl, pH 7.4, 2 mM EDTA, 2 mM EGTA, 1mM dithiothreitol, 10 μ g/ml leupeptin, 10 μ g/ml aprotonin, 10 μ g/ml trypsin inhibitor, 500 μ M 4-(2-aminoethyl)benzenesulfonyl fluoride (AEBSF), 1 mM NaF, and 1 mM sodium orthovanadate]. Cells were allowed to swell on ice for 1 h and homogenized by passage several times through a gauge 18 needle. Homogenates were centrifuged at 600 g for 20 min at 4°C to pellet the crude nuclear fraction. The supernatant was further centrifuged at 100 000 g for 30 min at 4 °C. Membranes were collected in the pellet and solubilized in buffer A containing 1% Triton X-100. The cytosol was recovered in the supernatant. The crude nuclear fraction was resuspended in buffer A containing 0.1% Triton X-100, layered over 30% sucrose (wt/v in buffer A), and centrifuged at 5000 g for 30 min at 4 °C. The pellet containing the nuclear fraction was resuspended in buffer A containing 1% Triton X-100 and sonicated on ice for 15 sec.

Quantitation of proteins in the cytosolic, membrane and nuclear fractions was made using the DC protein assay kit (Biorad, Mississauga, ON, Canada). For protein analysis, 50 μ g of proteins were resolved by SDS-PAGE on a 7,5% gel, transferred to a nitrocellulose membrane and immunodetected with monoclonal antibodies specific to PKC- α and PKC- δ (BD Bioscience Pharmingen, San Diego, CA, U.S.A.). The protein/antibody complex was revealed by chemiluminescence using the Western lightning kit (Perkin Elmer Life Sciences, Boston, MA, U.S.A.).

Statistical Analyses

Data generally represent the mean \pm SEM values from two independent cultures (each one performed in triplicate), except where indicated. One-way ANOVA followed by Duncan multiple range test was used to

determine statistical significance between individual means. Differences were considered significant at $P < 0.05$.

RESULTS

PTHrP(1-34) down-regulates Phex expression in UMR-106 cells

We tested the hypothesis that PTHrP(1-34), an hormone synthesized by osteoblasts and involved in the development of bones, could regulate Phex expression. For these studies, the densitometric values of Phex RT-PCR products were normalized by comparison with the values of two internal controls: the housekeeping genes β -actin and G3PDH. PTHrP(1-34) effects on Phex mRNA levels were similar with both internal controls (Fig. 1A and 1B). This supports the ability of our RT-PCR protocol to determine semi-quantitative changes in Phex mRNA levels. Data described below are those referring to β -actin. Incubation of cells for 16 h with PTHrP(1-34) at concentrations between 5×10^{-13} and 10^{-8} M had no significant effect on Phex mRNA levels. However, 16 h incubation with higher PTHrP(1-34) concentrations (10^{-7} and 10^{-6} M) significantly decreased Phex mRNA levels in a dose-dependent way (65 ± 3 % and 37 ± 5 % of control, respectively; $n=6$) (Fig. 1A). The effect of PTHrP(1-34) (10^{-6} M) was time-dependent showing statistically significant decrease at 11 h (63 ± 3 %, $n=6$) and a maximal effect at 16-24 h (47 ± 3 % and 37 ± 7 % respectively, $n=6$) (Fig. 1B). Under the same treatment conditions, mRNA levels of NEP, another member of the M13 family of peptidases present in osteoblasts (41), were not affected significantly, suggesting a specific effect of the hormone (Fig. 1A and B).

PTHrP(1-34) and PTH(1-34) effects on osteoblasts are mediated by the common type-1 PTH/PTHrP receptor (42-44), suggesting that PTH(1-34) could also reduce Phex expression. As expected, treatment of UMR-106 cells with rat-, bovine- or human-PTH(1-34) (10^{-7} M) for 24 h significantly reduced Phex mRNA levels (Table 1).

To determine whether Phex protein levels were also affected by treatment of cells with PTHrP(1-34), UMR-106 cells treated for 24 h with vehicle alone

or with 10^{-7} M PTHrP(1-34) were extracted, and the cell extracts analyzed by immunoblotting. Consistent with the decrease in mRNA levels, the presence of the hormone in the culture medium decreased the levels of Phex protein (Fig. 2).

Since PTHrP(1-34) and PTH(1-34) are known to activate the protein kinase C (PKC) and protein kinase A (PKA) signaling pathways through the common type-1 PTH/PTHrP receptor (42-44), we next determined the effects of activating independently either pathway on Phex expression.

PKC up-regulates Phex expression in UMR-106 cells

To determine whether PKC regulates Phex mRNA levels, cells were incubated for 16 h with increasing concentrations of TPA (from 10^{-10} to 10^{-6} M), a PKC activator. TPA induced a concentration-dependent increase in Phex mRNA levels; maximum (218 ± 17 %, $n=6$) at 10^{-8} M (Fig. 3A). TPA (10^{-8} M) caused a time-dependent increase of Phex expression (Fig. 3B). The maximal effect occurred at 16 h (238 ± 18 %, $n=6$); after 24 h of TPA exposure, mRNA levels returned toward control values (125 ± 22 %, $n=6$). Incubation of cells for 16 h with 4α -PDD (10^{-8} M), an inactive analogue of TPA, had no significant effect on Phex mRNA levels (Table 2; Experiment A). Treatment with TPA (10^{-8} M) for 16 h had no significant effect on NEP mRNA levels (not shown). As for PTHrP(1-34), the effect of TPA added to the culture medium at a concentration of 10^{-8} M for 24 h was also observed at the protein level (Fig. 2).

To demonstrate that PKC is involved in Phex mRNA up-regulation by TPA, cells were incubated for 16 h with the PKC inhibitor bisindolylmaleimide I (10^{-6} M), alone or in combination with 10^{-8} M TPA. Bisindolylmaleimide I did not modify significantly the basal Phex mRNA levels but interfered with the TPA-induced up-regulation (Table 2; Experiment B). These data demonstrate that PKC activation up-regulates Phex expression.

The cAMP pathway down-regulates Phex expression in UMR-106 cells

The involvement of the cAMP pathway in Phex expression was evaluated with forskolin, an adenylate cyclase activator. Forskolin present for 16 h down-regulated Phex mRNA levels in a dose-dependent manner, with a maximal effect ($47 \pm 6\%$, $n=6$) at 10^{-6} M (Fig. 4A). A time-dependent decrease of Phex mRNA was observed when cells were incubated with 10^{-6} M forskolin (Fig. 4B). A significant decrease ($75 \pm 2\%$, $n=6$) occurred at 6 h and a maximal effect was observed at 16-24 h ($32 \pm 5\%$ and $20 \pm 5\%$ respectively, $n=6$) (Fig. 4B). Treatment of cells for 16 h with an inactive analogue of forskolin, 1,9-dideoxyforskolin (10^{-6} M), did not change significantly Phex mRNA levels (Table 3; Experiment A). Forskolin at 10^{-6} M had no significant effect on NEP mRNA levels (not shown). Forskolin present at a concentration of 10^{-6} M for 24 h also had an inhibitory effect at the protein level (Fig. 2).

Adenylate cyclase activation augments intracellular cAMP levels. Incubation of cells for 16 h with the permeable cAMP analogue (Bu)₂cAMP (10^{-3} M) resulted in a decrease in Phex mRNA levels (Table 3; Experiment B). PKA is one of the major targets of cAMP. To determine whether (Bu)₂cAMP regulated Phex mRNA levels through PKA activation, cells were treated for 16 h with the PKA inhibitor H89, alone or in combination with (Bu)₂cAMP. H89 (10^{-8} M) had no significant effect on basal Phex mRNA levels but blocked the effect of 10^{-3} M (Bu)₂cAMP (Table 3; Experiment B), demonstrating that increased cAMP levels down-regulate Phex expression by PKA activation.

Interaction between PKC and PKA in the regulation of Phex mRNA levels in UMR-106 cells

Because diverse transduction pathways may interact at many levels, we determined whether the PKC and PKA pathways interact to regulate Phex

mRNA levels. Co-treatment for 16 h with maximal effective doses of TPA (10^{-8} M) and increasing concentrations of forskolin (10^{-10} to 10^{-6} M) caused a dose-dependent decrease in Phex mRNA levels. Compared to TPA (10^{-8} M), significant effects of forskolin were observed at 10^{-8} M ($60 \pm 3\%$), 10^{-7} M ($35 \pm 2\%$) and 10^{-6} M ($27 \pm 8\%$). These values are very similar to those obtained with forskolin alone (Fig. 5). This suggests that PKA activation inhibits efficiently the effect of PKC on Phex mRNA levels.

PTHrP(1-34) does not regulate Phex mRNA levels through PKC activation in UMR-106 cells

PTHrP(1-34) causes two peaks of PKC activation in rat osteosarcoma cells, one peak is observed at 10^{-12} - 10^{-11} M and the other at 10^{-9} - 10^{-8} M; a peak of adenylate cyclase activation is obtained at 10^{-7} M (42). Since a significant effect of PTHrP(1-34) was not detected in the pico/nano-molar range and its effect in the micromolar range, was opposite to that of PKC activation, the data suggested that PKC activation by PTHrP(1-34) did not regulate Phex expression. This result may be explained by an interference of PKA with the PKC pathway, and/or by the fact that the isozyme(s) activated by TPA to regulate Phex expression may differ from that used by PTHrP(1-34). To test the possibility that activation of the cAMP pathway may have masked PKC activation, cells were treated with bovine PTH(3-34), an agonist of the type-1 PTH/PTHrP receptor that activates PKC but not PKA (45-47). Incubation of cells for 16 h with bovine PTH (3-34) at concentrations between 10^{-10} and 10^{-7} M (data not shown), or for 24 h with 10^{-7} M bovine PTH (3-34) (Table 1) did not significantly alter Phex mRNA levels. This observation suggests that PTHrP(1-34) (or PTH1-34) does not activate the isozyme of PKC that increases Phex mRNA levels. UMR-106 cells are known to express several PKC isozymes (48), but only the PKC- δ was reported activated by PTH(1-34) (49). To test the effects of TPA and PTHrP(1-34) on activation of PKC- α and PKC- δ , recruitment of these isozymes to the plasma membrane and

nucleus, respectively, was determined by immunoblotting of fractionated extracts from control UMR-106 cells or cells treated with 10^{-8} M TPA or 10^{-7} M PTHrP(1-34). TPA but not PTHrP(1-34) provoked a displacement of PKC- α to the plasma membrane (Fig. 6A). As reported previously (49), TPA provoked a decrease in PKC- δ protein levels but no significant recruitment of this isozyme to the nucleus. In contrast, PTHrP(1-34) activated PKC- δ isozyme (Fig. 6B). These results using PTHrP(1-34) as agonist of the type-1 PTH/PTHrP receptor are consistent with a previous report by Erlick and Mitchell (49) showing activation of PKC- δ but not PKC- α by PTH(1-34), and clearly show that PTHrP(1-34) and TPA do not activate the same PKC isozymes.

In osteoblasts and osteoblastic cell lines, including UMR-106 cells, PTHrP(107-111) activates PKC through a receptor different from the type-1 PTH/PTHrP receptor (50,51). PTHrP(107-111) (10^{-7} M) did not significantly modify Phex mRNA levels at 24 h (Table 1). These results indicate that activation of an adequate PKC isozyme is necessary to up-regulate Phex mRNA levels. As expected, treatment of cells with bisindolylmaleimide \square (10^{-6} M) before incubation with 10^{-7} M PTHrP(1-34) for 16 h, did not prevent down-regulation of Phex mRNA levels (Table 2; Experiment C).

PTHrP(1-34) down-regulates Phex mRNA levels through PKA in UMR-106 cells

Because PTHrP(1-34) effects were similar to those of forskolin and (Bu) $_2$ cAMP, it is possible that PTHrP(1-34) down-regulates Phex mRNA levels through PKA. This was supported by the findings that human PTH(1-31) (10^{-7} M, for 24 h), a fragment of PTH that activates PKA but not PKC (44), decreased Phex mRNA levels even more efficiently than PTHrP(1-34) (10^{-7} M) (Table 1). To test directly this hypothesis, cAMP accumulation was measured in control UMR-106 cells and in cells treated with 10^{-6} M

forskolin or 10^{-7} M PTHrP(1-34). Both treatments produced a significant increase in intracellular cAMP accumulation that can be correlated with Phex mRNA down-regulation (Fig. 7A and 7B). In addition, co-treatment for 16 h with near maximal effective doses of forskolin (10^{-6} M) and PTHrP(1-34) (10^{-6} M) did not produce a significantly additive effect on Phex mRNA levels (Fig. 7B), further suggesting that both act through the same pathway. Finally, preincubation of cells with H89 (10^{-6} M) inhibited the effect of 10^{-7} M PTHrP(1-34) at 16 h (Table 3; Experiment C).

PTHrP(1-34) and forskolin but not TPA affect Phex mRNA levels in cultures of rat calvaria cells

To determine whether PTHrP(1-34), TPA and forskolin also regulate Phex gene expression in differentiating osteoblasts, we isolated calvaria cells from fetal rats and treated the cultures with the hormone or the drugs at days 7, 12, 16, 19 and 22 after seeding. Incubation of cells with both PTHrP(1-34) at 10^{-7} M and forskolin at 10^{-6} M for 16 h down-regulated Phex mRNA levels at day 7 ($55\% \pm 5$ and $59\% \pm 6$, respectively; $n=3$) (Fig. 8) of culture but not significantly at later stages (not shown). In contrast, incubation of cells with TPA at a concentration of 10^{-8} M for 16 h did not affect significantly Phex gene expression (Fig. 8).

DISCUSSION

Several studies have confirmed that PHEX/Phex has an important role in the regulation of bone mineralization (3, 16, 19, 24-31, 52-54). Therefore, the way Phex expression is controlled should profoundly influence bone mineralization. Accordingly, recent studies have shown that vitamin D3, glucocorticoids, insulin-like growth factor and growth hormone can regulate Phex expression in osteoblasts (27, 32-34). In the present work, we have demonstrated that PTHrP(1-34), an hormone involved in regulating bone development, down-regulates Phex expression at the mRNA and protein levels in UMR-106 cells. This effect is not restricted to this cell line because PTHrP(1-34) also down-regulates Phex expression in primary cultures of fetal rat calvaria cells. PTHrP(1-34) as well as PTH(1-34) are known to affect osteoblast metabolism through the common type-1 PTH/PTHrP receptor (42-44). In accordance, we have observed that ligands of the receptor reduced Phex mRNA levels; in contrast, a ligand (PTHrP₁₀₇₋₁₃₉) that activates PKC and regulates osteoblast function through a distinct receptor did not alter Phex mRNA levels. These data suggest that the common type-1 PTH/PTHrP receptor is the receptor used by PTHrP(1-34) to regulate Phex expression.

In osteoblasts, the common type-1 PTH/PTHrP receptor is coupled to Gs and Gq proteins that activate the PKA and PKC transduction pathways, respectively. Activation of PKC activity presents two peaks: the first is reached at 10^{-12} - 10^{-11} M of ligand and the second at 10^{-9} - 10^{-8} M (42-43). In contrast, 10^{-7} M of ligand is needed to observe a maximal increase in intracellular cAMP levels and PKA activation (42-43). The following evidences suggest that PTHrP(1-34) activates PKA. 1) PTHrP(1-34) down-regulated Phex expression only in the 10^{-7} - 10^{-6} M range. 2) Human PTH(1-31), a ligand of the common type-1 PTH/PTHrP receptor that activates PKA but not PKC, also decreased Phex mRNA levels. 3) Forskolin and

(Bu)₂cAMP mimicked PTHrP(1-34) effects on Phex regulation but 1-9-dideoxyforskolin, an analog that mimics the adenylate-cyclase-independent effects of forskolin (55,56), had no effect on Phex expression. 4) Phex down-regulation correlated with increased intracellular cAMP accumulation provoked by PTHrP(1-34) and forskolin. 5) Co-treatment with near maximal effective doses of forskolin and PTHrP(1-34) did not produce an additive effect on Phex mRNA levels, indicating that both factors may act by the same pathway. 6) Finally, the target of increased intracellular cAMP accumulation is probably PKA since a specific inhibitor of PKA, H89, blocked the effects of PTHrP(1-34) and (Bu)₂cAMP. All these data indicate that PTHrP(1-34) uses the cAMP pathway to down-regulate Phex expression through PKA activation.

We have observed down-regulation of Phex expression only at high PTHrP(1-34) concentrations (10^{-7} and 10^{-6} M). This suggests that PTHrP(1-34), produced locally by osteoblasts, acts in a paracrine/autocrine pathway. It probably also excludes a role for PTH(1-34), produced by the parathyroid glands, in regulating Phex gene expression, since this hormone is found circulating at much lower levels (approximately 10^{-12} M; 57).

We also observed that incubation of UMR-106 cells with a phorbol ester that activates PKC (TPA) increased Phex expression. However, when PTHrP(1-34) was used in the concentration range (5×10^{-13} - 10^{-9} M) that activates PKC but not the cAMP pathway, Phex mRNA levels were not modified. Similar results were obtained when cells were incubated with bovine PTH(3-34) that binds the common type-1 PTH/PTHrP receptor and activates the PKC but not the cAMP pathway. One possibility to explain this discrepancy is to postulate that, since PKC is a superfamily of isozymes with different regulatory properties (58) and since normal osteoblasts and many osteoblastic cell lines, including UMR-106 cells, express several isozymes (48), the PKC isozyme(s) that PTHrP(1-34) or PTH(1-34) activates in UMR-106 cells is distinct from the isozyme(s) induced by TPA that regulates Phex expression. Our results indicate that in UMR-106 cells

TPA and PTHrP(1-34) do indeed activate different PKC isozymes: the α and δ isozymes, respectively. These findings suggest that PKC- α can regulate Phex gene expression whereas PKC- δ , which is coupled to the type-1 PTH/PTHrP receptor, has no effect on Phex expression.

In osteoblasts, downstream signaling from PKA and PKC involves transcription factors which regulate gene expression. The murine Phex gene promoter has several potential cis-acting elements including binding sites for CREB (cAMP response element binding protein), AP1 (activator protein 1), glucocorticoid receptor (GR) and estrogen receptor (ER) (59). Transactivation of CREB induced by PTH(1-34) is mediated by PKA but not by PKC or calcium in osteoblastic cells (60,61). PTH(1-34) also regulates the expression of c-fos and c-jun, components of the AP1 transcription factor (60). Our results indicate that CRE and/or AP1 elements may mediate the effects on Phex expression of PTHrP(1-34) and TPA, respectively.

Interestingly, the effects of PTHrP(1-34) on primary cultures of rat calvaria cells were restricted to an early stage of culture: Inhibition of Phex mRNA levels was observed at day 7 but not later. This observation is best explained by a down-regulation of the type-1 PTH/PTHrP receptor as cells progress towards final differentiation. This phenomenon has been well documented in primary cultures of rat calvaria cells (62). In addition, higher levels of PTHrP expression are found in less differentiated cells (63,64). In contrast to the expression patterns of PTHrP and its receptor, we have observed that Phex expression in rat calvaria cells is weak at day 7, starts to increase around day 10 and reaches a maximum at day 15 corresponding with mineralization (results not shown). Thus, there is an inverse correlation between the expression of Phex and that of PTHrP(1-34) and its receptor. We suggest that PTHrP(1-34) acting in an autocrine or paracrine way down-regulates Phex expression in osteoprogenitor cells and pre-osteoblasts.

We see no effect of TPA on Phex expression in primary cultures of rat calvaria cells. This can be explained by the absence in these cells of the

isozyme(s) responsible for Phex gene activation. Alternatively, the presence in these cultures of autocrine/paracrine factor(s) activating the PKA pathway may mask the effect of TPA, as we observed in this study when increasing concentrations of forskolin were added to TPA-stimulated cells. In conclusion, the work presented in this paper demonstrates that PTHrP(1-34) by binding to the common type-1 PTH/PTHrP receptor down-regulates Phex expression through activation of the PKA transduction pathway. This role of PTHrP(1-34) may be important for the timing of Phex expression in differentiating osteoprogenitor cells. It would be interesting to determine whether other hormones that activate PKA or PKC and regulate the mineralization of bone also regulate the expression of Phex.

ACKNOWLEDGMENTS

We are grateful to Damian Barbas for his help in measuring cAMP levels.

REFERENCES

1. **The HYP Consortium** 1995 A gene (PEX) with homologies to endopeptidases is mutated in patients with X-linked hypophosphatemic rickets. *Nat Genet* 11:130-136
2. **Tenenhouse HS, Econs MJ** 2001 Mendelian hypophosphatemias. In: *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*. Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D, editors. Ch. 197, pp. 5039-5067, McGraw Hill Book Co., New York
3. **Beck L, Soumounou Y, Martel J, Krishnamurthy G, Gauthier C, Goodyer CG, Tenenhouse HS** 1997 Pex/PEX tissue distribution and evidence for a deletion in the 3' region of the Pex gene in X-linked hypophosphatemic mice. *J Clin Invest* 99:1200-1209
4. **Eicher EM, Southard JL, Scriver CR, Glorieux FH** 1976 Hypophosphatemia: Mouse model for human familial hypophosphatemic (vitamin D resistant) rickets. *Proc Natl Acad Sci USA* 73:4667-4671
5. **Tenenhouse HS, Werner A, Biber J, Ma S, Martel J, Roy S, Murer H** 1994 Renal Na^+ -phosphate cotransporter in murine X-linked hypophosphatemic rickets. Molecular characterization. *J Clin Invest* 93:671-676
6. **Tenenhouse HS, Roy S, Martel J, Gauthier C** 1998 Differential expression, abundance and regulation of Na^+ -phosphate cotransporter genes in murine kidney. *Am J Physiol* 268:1062-1069
7. **Meyer Jr RA, Meyer MH, Gray RW** 1989 Parabiosis suggests a humoral factor is involved in X-linked hypophosphatemia in mice. *J Bone Miner Res* 4:493-500
8. **Nesbitt T, Coffman T, Griffiths R, Drezner M** 1992 Crosstransplantation of kidneys in normal and Hyp mice: evidence that the Hyp mouse phenotype is unrelated to an intrinsic renal defect. *J Clin Invest* 89:1453-1459

9. **Econs MJ, Drezner MK** 1994 Tumor-induced osteomalacia: unveiling a new hormone. *N Engl J Med* 330:1679-1681
10. **Lajeunesse D, Meyer RA Jr, Hamel L** 1996 Direct demonstration of a humorally mediated inhibition of renal phosphate transport in the Hyp mouse. *Kidney Int* 50:1531-1538
11. **Nesbitt T, Fujiwara I, Thomas R, Xiao Z-S, Quarles LD, Drezner MK** 1999 Coordinated maturational regulation of PHEX and renal phosphate transport inhibitory activity: evidence for the pathophysiology role of PHEX in X-linked hypophosphatemia. *J Bone Miner Res* 14:2027-2035.
12. **Schiavi SC, Moe OW** 2002 Phosphatonins: a new class of phosphate-regulating proteins. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 11: 423-430
13. **Shimada T, Mizutani S, Muto T, Yoneya T, Hino R, Takeda S, Takeuchi Y, Fujita T, Fukumoto S, Yamashita T** 2001 Cloning and characterization of FGF23 as a causative factor of tumor induced osteomalacia. *Proc Natl Acad Sci USA* 98: 6500-6505
14. **Rowe PNS, De Zoysa PA, Dong R, Wang HR, White KE, Econs MJ, Oudet CL** 2000 MEPE, a new gene expressed in bone marrow and tumors causing osteomalacia *Genomics* 67: 54-68
15. **Jan de Beur SM, Finnigan RB, Vassiliadis J, Cook B, Barberio D, Estes S, Manavalan P, Petroziello J, Madden SL, Cho JY, Kumar R, Levine MA, Schiavi SC** 2002 Tumors associated with oncogenic osteomalacia express genes important in bone and mineral metabolism. *J Bone Miner Res* 17:1102-1110
16. **Du L, Desbarats M, Viel J, Glorieux FH, Cawthorn C, Ecarot B** 1996 cDNA cloning of the murine Pex gene implicated in X-linked hypophosphatemia and evidence for expression in bone. *Genomics* 36:22-28
17. **Strom TM, Francis F, Lorenz B, Böddrich A, Econs MJ, Lehrach H, Meitinger T** 1997 Pex gene deletions in Gy and Hyp mice provide mouse models for X-linked hypophosphatemia. *Hum Mol Genet* 6:165-171

18. **Grieff M, Mumm S, Waeltz P, Mazarella R, Whyte MP, Thakker RV, Schlessinger D** 1997 Expression and cloning of the human X-linked hypophosphatemia gene cDNA. *Biochem Biophys Res Commun* 231:635-639
19. **Guo R, Quarles LD** 1997 Cloning and sequencing of human PEX from a bone cDNA library: evidence for its developmental stage-specific regulation in osteoblasts. *J Bone Miner Res* 12:1009-1017
20. **Lipman ML, Panda D, Bennety HPJ, Henderson JE, Shane E, Shen Y, Goltzman D, Karaplis AC** 1998 Cloning of human Pex cDNA. Expression, subcellular localization, and endopeptidase activity. *J Biol Chem* 273:13729-13737
21. **Barret JA, Rawlings ND Woessner JF** 2000 Handbook of proteolytic enzymes. Academic Pres, London, UK
22. **Roques BP, Noble F, Dauge V, Fournie-Zaluski M-C, Beaumont A** 1993 Neutral endopeptidase 24.11: structure, inhibition, and experimental and clinical pharmacology. *Pharmacol Rev* 45:87-146
23. **Turner AJ** 1997 Endothelin converting enzyme. In: *Cell-Surface Peptidases in Health and Disease*. Kenny AJ, Boustead CM (eds.) BIOS Scientific Publishers Ltd., Oxford pp137-153
24. **Ruchon AF Marcinkiewicz M, Siegfried G, Tenenhouse HS, DesGroseillers L, Crine P, Boileau G** 1998 Pex mRNA is localized in developing mouse osteoblasts and odontoblasts. *J Histochem Cytochem* 46:459-468
25. **Ruchon AF, Tenenhouse HS, Marcinkiewicz M, Siegfried G, Aubin JE, DesGroseillers L, Crine P, Boileau G** 2000 Developmental expression and tissue distribution of Phex protein: Effect of the hyp mutation and relationship to bone markers. *J Bone Miner Res* 15:1440-1450
26. **Thompson DL, Sabbagh Y, Tenenhouse HS, Roche PC, Drezner MK, Salisbury JL, Grande JP, Poeschla EM, Kumar R** 2002 Ontogeny of Phex/PHEX protein expression in mouse embryo and subcellular localization in osteoblasts. *J Bone Miner Res* 17:311-320

27. **Ecarot B, Desbrats M** 1999 1,25-(OH)₂D₃ down-regulates expression of Phex, a marker of the mature osteoblast. *Endocrinology* 140:1192-1199
28. **Ecarot-Charrier B, Desbarats F, Travers R, Desbarats M, Bouchard F, Hinek A** 1988 Defective bone formation by transplanted Hyp mouse bone cells into normal mice. *Endocrinology* 123:768-773
29. **Ecarot B, Glorieux F, Desbarats M, Travers R, Labelle L** 1992 Defect bone formation by Hyp mouse bone cells transplanted into normal mice: evidence in a favor of an intrinsic osteoblast defect. *J Bone Miner Res* 7:215-220
30. **Xiao ZS, Crenshaw M, Guo R, Nesbitt T, Drezner MK, Quarles LD** 1998 Intrinsic mineralization defect in Hyp mouse osteoblasts. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 275:E700-E709
31. **Miao D, Bai X, Panda D, McKee M, Karaplis A, Goltzman D** 2001 Osteomalacia in Hyp mice is associated with abnormal Phex expression and with altered bone matrix protein expression and deposition. *Endocrinology* 142:926-939
32. **Hines ER, Collins JF, Jones M, Serey SH, Ghishan FK** 2002 Glucocorticoid regulation of the murine PHEX gene. *Am J Physiol Renal Physiol* 283:F356-F363
33. **Zoidis E, Gosteli-Peter M, Ghirlanda-Keller C, Meinel L, Zapf J, Schmid C** 2002 IGF-I and GH stimulate Phex mRNA expression in lungs and bones and 1,25-dihydroxyvitamin D₃ production in hypophysectomized rats. *Eur J Endocrinol* 146:97-105
34. **Zoidis E, Zapf J, Schmid C** 2000 Phex cDNA cloning from rat bone and studies on Phex mRNA expression: tissue-specificity, age-dependency, and regulation by insulin-like growth factor (IGF) in vivo. *Mol Cell Endocrinol* 168:41-55
35. **Partridge NC, Alcorn D, Michelangeli VP, Ryan G, Martin TJ** 1983 Morphological and biochemical characterization of four clonal osteogenic sarcoma cell lines of rat origin. *Cancer Res* 43:4308-4314

36. **Inoue D, Matsumoto T** 2000 Parathyroid hormone-related peptide and bone: pathological and physiological aspects. *Biomed Pharmacother* 54 (Suppl 1):32-41
37. **Karaplis AC** 2001 PTHrP: novel roles in skeletal biology. *Curr Pharm Des* 7:655-670
38. **Bonnelye E, Merdad L, Kung V, Aubin JE** 2001 The orphan nuclear estrogen receptor-related receptor α (ERR α) is expressed throughout osteoblast differentiation and regulates bone formation in vitro. *J Cell Biol* 153:971-983
39. **Pineyro G, Azzi M, De Léan A, Schiller P, Bouvier M** 2001 Short-term inverse-agonist treatment induces reciprocal changes in δ -opioid agonist and inverse-agonist binding capacity. *Mol Pharmacol* 60:816-827
40. **Hsu SL, Chou YH, Yin SC, Liu JY** 1998 Differential effects of phorbol ester on growth and protein kinase C isozymes regulation in human hepatoma Hep3B cells. *Biochem J* 333:57-64
41. **Ruchon AF, Marcinkiewicz M, Ellefsen, K, Aubin, JE, Crine, P, Boileau G** 2000 Cellular localization of neprilysin in mouse bone tissue and putative role in hydrolysis of osteogenic peptides. *J Bone Miner Res* 15:1266-1273
42. **Gagnon L, Jouishomme H, Whitfield JF, Durkin JP, Maclean S, Neugebauer W, Willick G, Rixon RH, Chakravarthy B** 1993 Protein kinase C-activating domains of parathyroid hormone-related protein. *J Bone Miner Res* 3:497-503
43. **Jouishomme H, Whitfield JF, Chakravarthy B, Durkin JP, Gagnon L, Isaacs RJ, MacLean S, Neugebauer W, Willick G, Rixon RH** 1992 The protein kinase-C activation domain of the parathyroid hormone. *Endocrinology* 130:53-60
44. **Blind E, Raue F, Knappe V, Schroth J, Ziegler R** 1993 Cyclic AMP formation in rat bone and kidney cells is stimulated equally by parathyroid

hormone-related protein (PTHrP) 1-34 and PTH 1-34. *Exp Clin Endocrinol* 101:150-155

45. **Chakravarthy BR, Durkin JP, Rixon RH, Whitfield JF** 1990 Parathyroid hormone fragment (3-34) stimulates protein kinase C (PKC) activity in rat osteosarcoma and murine T-lymphoma cells. *Biochem Biophys Res Commun* 171:1105-1110

46. **Fujimore A, Cheng SL, Avioli LV, Civitelli R** 1992 Structure-function relationship of parathyroid hormone: Activation of phospholipase C, protein kinase-A and -C in osteosarcoma cells. *Endocrinology* 130:29-36

47. **Jouishomme H, Whitfield JF, Gagnon L, Maclean S, Isaacs RJ, Chakravarthy B, Durkin JP, Neugebauer W, Willick G, Rixon RH** 1994 Further definition of the protein kinase C activation domain of the parathyroid hormone. *J Bone Miner Res* 9:943-949

48. **Sanders JL, Stern PH** 1996 Expression and phorbol ester-induced down-regulation of protein kinase C isozymes in osteoblasts. *J Bone Miner Res* 11: 1862-1872

49. **Erclik MS, Mitchell J** 2002 The role of protein kinase C- δ in PTH stimulation of IGF-binding protein-5 mRNA in UMR-106-01 cells. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 282:E534-E541

50. **Valin A, Garcia-Ocaña A, de Miguel F, Sarasa J.L, Esbrit P** 1997 Antiproliferative effect of the C-terminal fragments of parathyroid hormone-related protein, PTHrP-(107-111) and (107-139), on osteoblastic osteosarcoma cells. *J Cell Physiol* 170:209-215

51. **Valin A, de Miguel F, Garcia-Ocaña A, Esbrit P** 1999 Parathyroid hormone-related protein (107-111) decreased alkaline phosphatase in osteoblastic osteosarcoma cells UMR 106 by a protein kinase C-dependent pathway. *Calcif Tissue Int* 65:148-151

52. **Shih NR, Jo OD, Yanagawa N** 2002 Effects of PHEX antisense in human osteoblast cells. *J Am Soc Nephrol* 17:394-399

53. **Liu S, Guo R, Tu Q, Quarles LD** 2001 Overexpression of Phex in osteoblasts fails to rescue the Hyp mouse phenotype. *J Biol Chem* 277:3686-3697
54. **Bai X, Miao D, Panda D, Grady S, McKee MD, Goltzman D, Karaplis AC** 2002 Partial rescue of the Hyp phenotype by osteoblast-targeted PHEX (phosphate-regulating gene with homologies to endopeptidases on the X chromosome) expression. *Mol Endocrinol* 16:2913-2925
55. **Hoshi T, Garber SS, Aldrich RW** 1988 Effect of forskolin on voltage-gated K⁺ channels is independent of adenylate cyclase activation. *Science* 240:1652-1655
56. **Park TJ, Jim KT** 1996 Cyclic AMP-independent inhibition of voltage-sensitive calcium channels by forskolin in PC12. *J Neurochem* 66:83-88
57. **Urena P, de Vernejoul M-C** 1999 Circulating biochemical markers of bone remodeling in uremic patients. *Kidney Int* 55:2141-2156
58. **Nishizuka Y** 1992 Intracellular signaling by hydrolysis of phospholipids and activation of protein kinase C. *Science* 258:607-614
59. **Hines ER, Collins JF, Ghisan FK** 2000 Molecular cloning of the murine Phex gene promoter. *Biochem Biophys Acta* 1493:333-336
60. **Tyson DR, Swarthout JT, Partridge NC** 1999 Increased osteoblastic c-fos by parathyroid hormone requires protein kinase A phosphorylation of the cyclic adenosine 3',5'-monophosphate response element-binding protein at serine 133. *Endocrinology* 140:1255-1261
61. **Clohisy JC, Scott DK, Brakenhoff KD, Quinn CO, Partridge NC** 1992 Parathyroid hormone induces c-fos and c-jun messenger RNA in rat osteoblastic cells. *Mol Endocrinol* 6:1834-1842
62. **McCauley LK, Koh AJ, Beecher CA, Cui Y, Rosol TJ, Franceschi RT** 1996 PTH/PTHrP receptor is temporally regulated during osteoblast differentiation and is associated with collagen synthesis. *J Cell Biochem* 61: 638-647

63. **Suda N, Gillespie MY, Traianedes K, Zhou H, Ho PW, Hards DK, Allan EH, Martin TJ, Moseley JM** 1996 Expression of parathyroid hormone-related protein in cells of osteoblast lineage. *J Cell Physiol* 166: 94-104
64. **Oyajobi BO Lomri A, Hott M, Marie PJ** 1999 Isolation and characterization of human clonogenic osteoblast progenitors immunoselected from fetal bone marrow stroma using STRO-1 monoclonal antibody. *J Bone Miner Res* 14: 351-361

Table I : Effects of PTHrP (1-34), PTHrP(107-111), PTH(1-34) and PTH fragments on Phex mRNA levels in UMR-106 cells.

Hormones	Phex-cDNA/ β -actin-cDNA (% of control)
control	100 \pm 4
PTHrP (1-34)	64 \pm 2*
rPTH (1-34)	59 \pm 2*
bPTH (1-34)	57 \pm 3* [#]
bPTH (3-34)	90 \pm 8
hPTH (1-34)	47 \pm 2*
hPTH (1-31)	37 \pm 4*
PTHrP (107-111)	98 \pm 9

Phex mRNA levels were determined by RT-PCR in cells incubated for 24 h in the absence of hormone (control) or in the presence of the hormones at concentration of 10^{-7} M. Data are presented as the percent of Phex mRNA levels in control (n=6). Data were analyzed by one-way ANOVA followed by Duncan's multiple range test: *P<0.01 with respect to control, [#]P<0.01 with respect to bPTH (3-34).

Table V : Effects of protein kinase C pathway on Phex mRNA levels in UMR-106 cells.

Treatments	Phex-cDNA/ β -actin-cDNA (% of control)	
Experiment A		
control	100 \pm 5	(6)
TPA	200 \pm 13*	(6)
4 α -PDD	104 \pm 7	(6)
Experiment B		
control	100 \pm 8	(3)
TPA	253 \pm 9*	(3)
bisindolylmaleimide I	91 \pm 2	(3)
TPA + bisindolylmaleimide I	140 \pm 8 [#]	(3)
Experiment C		
control	100 \pm 2	(3)
PTHrP(1-34)	60 \pm 7*	(3)
bisindolylmaleimide I	104 \pm 3	(3)
PTHrP(1-34) + bisindolylmaleimide I	70 \pm 3*	(3)

Phex mRNA levels were determined by RT-PCR in cells incubated for 16 h in the absence of drug (control) or in the presence of 10^{-8} M TPA or 4 α -PDD (experiment A), or of 10^{-6} M bisindolylmaleimide I alone or in combination with TPA (experiment B), or of 10^{-7} M PTHrP(1-34) or of 10^{-6} M bisindolylmaleimide I alone or in combination with PTHrP(1-34) (experiment C). Data are presented and analyzed as in Table 1. *P<0.01 compared with their respective controls, [#]P<0.01 compared with TPA group.

Table VI : Effects of cAMP pathway on Phex mRNA levels in UMR-106 cells.

Treatments	Phex-cDNA/ β -actin-cDNA (% of control)
<hr/> Experiment A	
control	100 \pm 5 (6)
forskolin	30 \pm 2* (6)
1,9-dideoxyforskolin	87 \pm 5 (6)
<hr/> Experiment B	
control	100 \pm 12 (3)
(Bu) ₂ cAMP	70 \pm 4* (3)
H89	100 \pm 6 (3)
(Bu) ₂ cAMP + H89	115 \pm 11 [#] (3)
<hr/> Experiment C	
control	100 \pm 2 (3)
PTHrP(1-34)	60 \pm 7* (3)
H89	109 \pm 4 (3)
PTHrP(1-34) + H89	92 \pm 6 ^{&} (3)

Phex mRNA levels were determined by RT-PCR in cells incubated for 16 h in the absence of drug (control) or in the presence of 10⁻⁶ M forskolin or 1,9-dideoxyforskolin (experiment A), or with 10⁻³ M (Bu)₂cAMP or with 10⁻⁸ M H89 alone or in combination with (Bu)₂cAMP (experiment B), or with 10⁻⁷ M PTHrP(1-34) or with 10⁻⁸ M H89 alone or in combination with PTHrP(1-34) (experiment C). Data are presented and analyzed as in Table 1.

*P<0.01 compared with respective controls, [#]P<0.01 compared with (Bu)₂cAMP group, [&]P<0.01 compared with PTHrP(1-34) group.

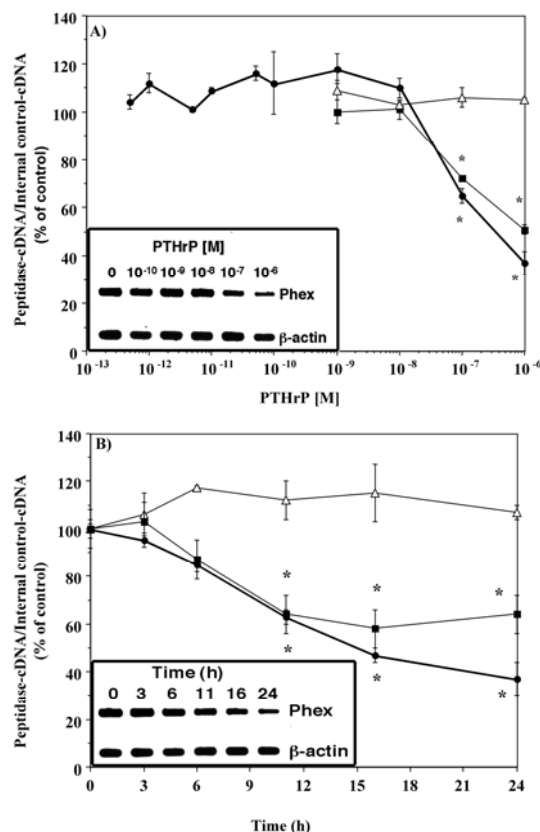


Figure 1. Dose-response and time-course of PTHrP(1-34) effects on Phex and NEP mRNA levels in UMR-106 cells. Cells were incubated with either various concentrations of PTHrP(1-34) for 16 h (A), or 10^{-6} M PTHrP(1-34) for the time indicated (B). RNA was extracted and Phex or NEP mRNA levels determined by RT-PCR as indicated in Materials and Methods. Data are presented as the percent of Phex or NEP mRNA levels in controls (n=6). Phex mRNA levels were normalized by comparison with β -actin or G3PDH mRNA levels, and NEP mRNA levels with β -actin mRNA levels. Data were analyzed by one-way ANOVA followed by Duncan's multiple range test: *P<0.01 compared to control. Inserts in A and B show the results of a representative RT-PCR amplification in each experimental condition. Solid circles: Phex/ β -actin ratio; open triangles: NEP/ β -actin ratio; solid squares: Phex/G3PDH ratio.

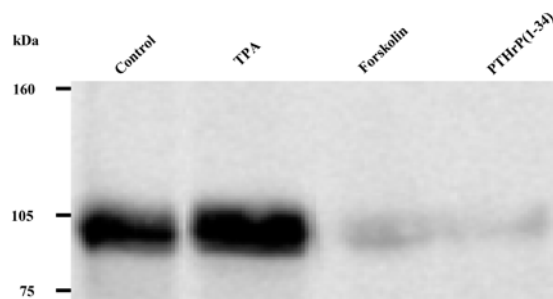


Figure 2. PTHrP(1-34), forskolin and TPA regulate Phex protein levels in UMR-106 cells. Cells were incubated for 24 h with either PTHrP(1-34) (10^{-7} M), TPA (10^{-8} M), forskolin (10^{-6} M) or vehicle alone. Proteins were extracted as described in Material and Methods and 50 μ g of protein were resolved by SDS-PAGE on a 7,5% polyacrylamide gel. Phex protein was revealed using an anti-PHEX antibody.

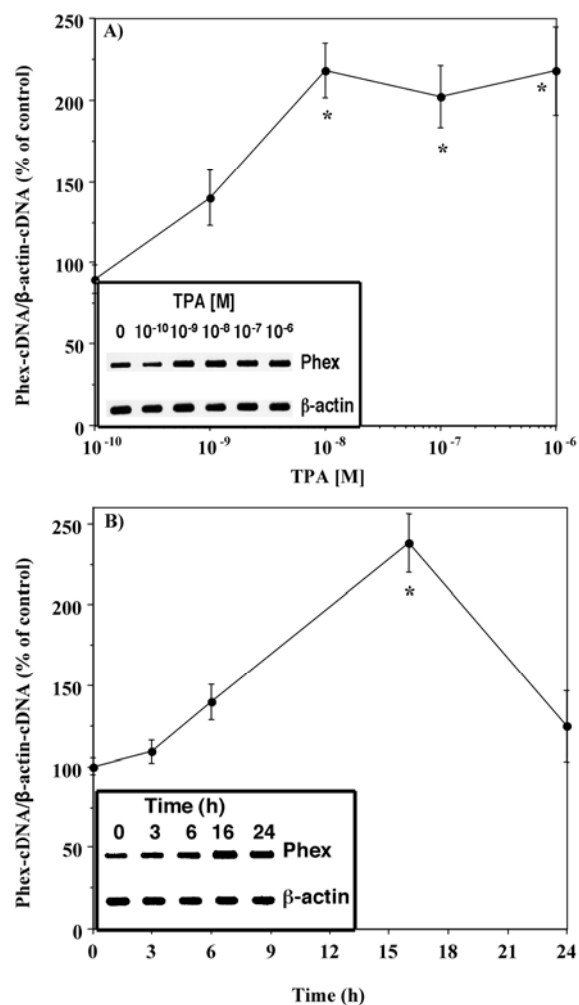


Figure 3. Dose-response and time-course of TPA effects on Phex mRNA levels in UMR-106 cells. Cells were incubated with either various concentrations of TPA for 16 h (A), or 10^{-8} M TPA for the time indicated (B). Phex mRNA level determination and data analysis were as described in Figure 1: (n=3) *P<0.01 compared to control. Inserts in A and B show the results of a representative RT-PCR amplification in each experimental condition.

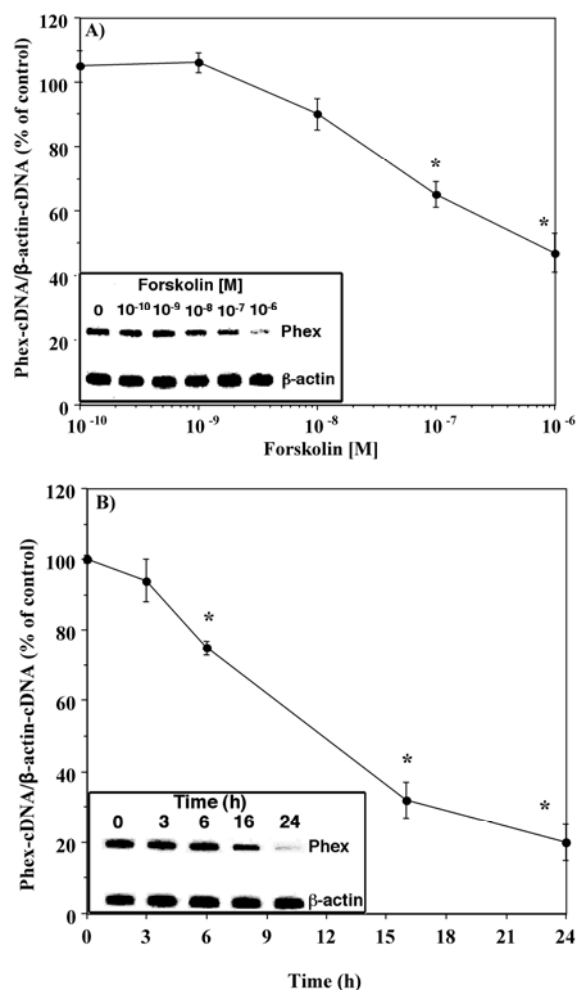


Figure 4. Dose-response and time-course of forskolin effects on Phex mRNA levels in UMR-106 cells. Cells were incubated with either various concentrations of forskolin for 16 h (A), or 10^{-6} M forskolin for the time indicated (B). Phex mRNA level determination and data analysis were as described in Figure 1: (n=3) *P<0.01 compared to control. Inserts in A and B show the results of a representative RT-PCR amplification in each experimental condition.

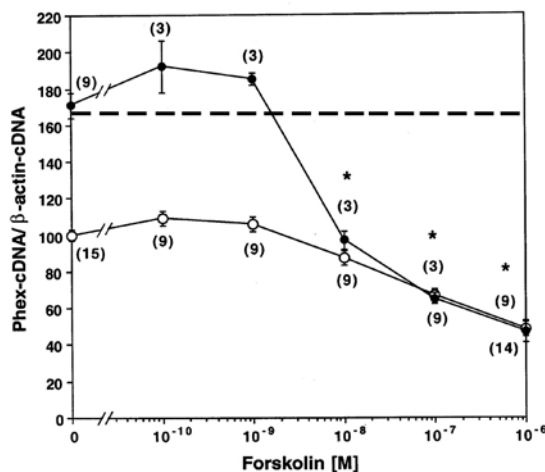


Figure 5. Forskolin blocks TPA effect on Phex mRNA levels in UMR-106 cells. Cells were treated with increasing concentrations of forskolin alone (open circles) or in combination with 10^{-8} M TPA (solid circles) for 16 h. Phex mRNA level determination and data analysis were as described in Figure 1. Dashed line shows the levels of Phex expression in cells treated with 10^{-8} M TPA. Numbers in parenthesis indicate the number of determination for each point (solid circles). * $P < 0.01$ with respect to 10^{-8} M TPA alone.

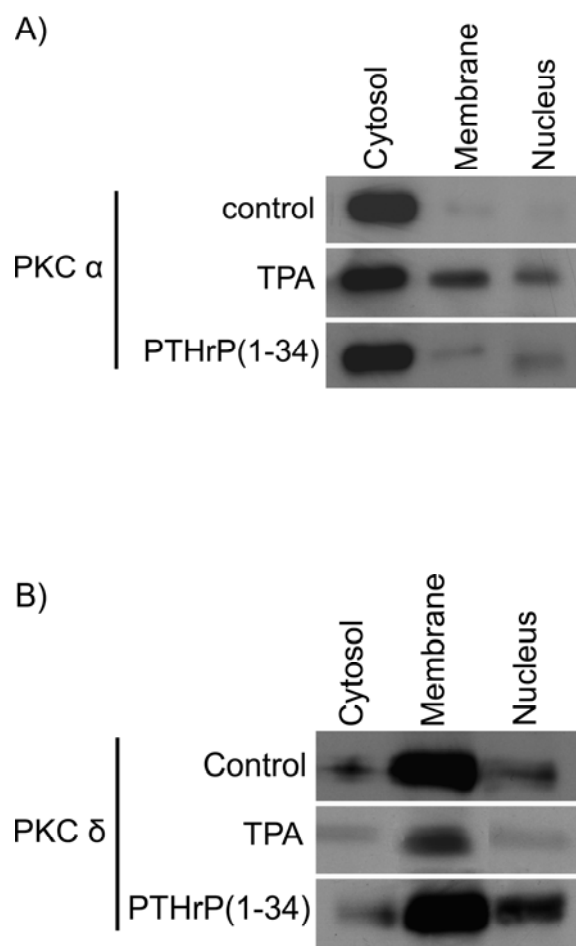


Figure 6. Activation of PKC isozymes in UMR-106 cells by TPA and PTHrP(1-34). UMR-106 control cells or cells treated with 10^{-7} M PTHrP(1-34) or 10^{-8} M TPA were fractionated and subcellular fractions analyzed by immunoblotting with an anti-PKC- α antibody (A) or an anti-PKC- δ antibody (B).

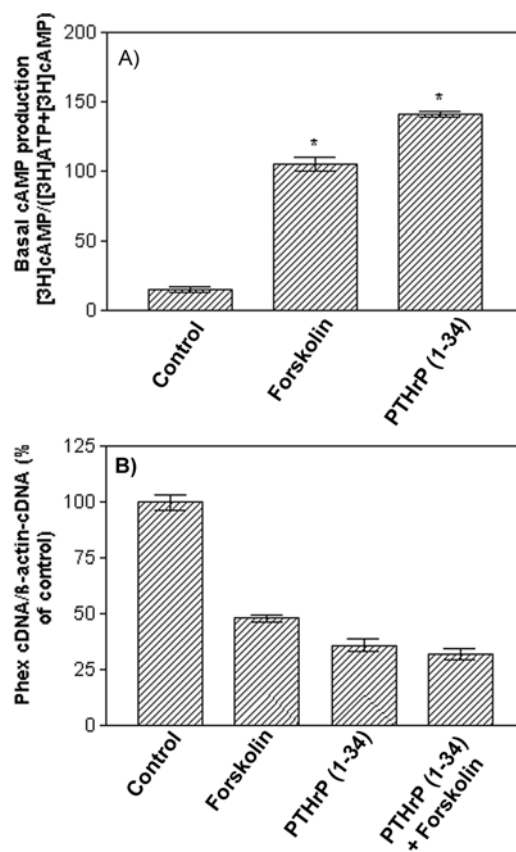


Figure 7. PTHrP(1-34) and forskolin increase intracellular cAMP and their effects on Phex mRNA levels are not additive in UMR-106 cells.

A): Cells were treated with 10^{-6} M forskolin or 10^{-7} M PTHrP(1-34) and the ratio $[3H]cAMP/([3H]ATP+[3H]cAMP)$ was determined to assess the activation of the cAMP pathway. (B): Cells were treated with 10^{-7} M PTHrP(1-34) or 10^{-6} M forskolin alone or in combination with PTHrP(1-34) for 16 h. Phex mRNA level determination and data analysis were as described in Figure 1: (n=9 in A; n=3 in B) *P<0.01 compared to control.

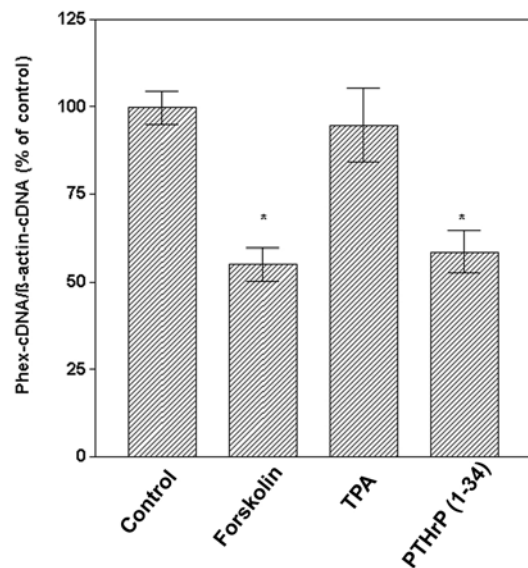


Figure 8. PTHrP(1-34) and forskolin down-regulate Phex mRNA levels in calvaria cells. Calvaria cells at day 7 of culture were treated for 16 hours with either PTHrP(1-34) (10^{-7} M), TPA (10^{-8} M), forskolin (10^{-6} M) or vehicle alone (control). Phex mRNA level determination and data analysis were as described in Figure 1: (n=3) *P<0.01 compared to control.

Chapitre 3 – Article: PHEX cytosolic di-acidic motif is important for its incorporation in bone matrix vesicles.

Mise en contexte

PHEX est une protéine importante pour la minéralisation. Des études ont démontré que des mutations ou l'ablation génique de *Phex* chez la souris causent des défauts de minéralisation. La minéralisation se fait grâce aux vésicules de calcification. Peu d'études traitent de la présence de protéines spécifiquement empaquetées dans ces vésicules de calcification.

La présente étude permet de mettre en évidence que la protéine PHEX est incorporée spécifiquement dans les vésicules de calcification grâce à un motif di-acide présent au niveau de sa queue cytosolique. Des protéines chimériques contenant cette queue cytosolique ont été amenées dans les vésicules de calcification, n'y étant pas présentes *a priori*. De plus, la surexpression de cette queue cytosolique semblerait donner un rôle à ce motif di-acide pour la minéralisation des cellules MC3T3.

Cet article est en préparation pour soumission dans la revue *Human molecular genetics*.

Note : Contribution(s) des auteurs

MSL : Culture cellulaire et infections, essais de minéralisation, immunobuvardages, construction des protéines chimériques, biotinylation de surface et traitements aux endoglycosidases, chasse à la méthionine ³⁵S, essais enzymatiques de PHEX, RT-PCR, participation à l'écriture du manuscrit.

VB : Biologie moléculaire et construction des protéines chimériques.

GB : Supervision générale et écriture du manuscrit.

PHEX cytosolic di-acidic motif is important for its incorporation in bone matrix vesicles.

**Mathieu St-Louis¹, Véronique Bériault¹, Luc Desgroseillers¹
and Guy Boileau¹**

1) Département de Biochimie; Université de Montréal; C.P. 6128, Succ. Centre-Ville, Montréal, Québec, H3C 3J7; Canada

Keywords: PHEX, mineralization, Matrix Vesicles, osteoblasts, COPII

Guy Boileau, PhD
Université de Montréal
Département de Biochimie, E-521
C.P. 6128, Succ. Centre-ville
Montréal, Qc, H3C 3J7
Phone 514-343-6328
Fax 514-343-2210

ABSTRACT

PHEX is a membrane type II integral protein member of the M13 family of zinc metalloendopeptidase and is expressed predominantly in bones and teeth from osteoblasts and odontoblasts, respectively. Patients suffering from XLH and the *Hyp* mouse, which has been used widely as an animal model of the human disease, show mineralization defects and growth retardation. Different mutations in the *Phex* gene results in loss of function of the PHEX protein. The E4Q mutation present on the intracellular domain of PHEX was studied. This mutation does not interfere with the catalytic site of the enzyme since this PHEX mutant can still cleave a synthetic substrate as well as wildtype protein. This mutation disrupts a di-acidic motif present in the cytosolic domain of PHEX. We showed that this di-acidic motif is responsible for the interaction of PHEX with COPII, a protein complex involved in the formation of secretion vesicles. Moreover, it would seem that this di-acidic motif is important, probably by its interaction with COPII, to the incorporation of PHEX in matrix vesicles, which are important in the mineralization process. Finally, competition assays showed that mineralization could be disturbed when the wildtype PHEX cytosolic tail is overexpressed, as opposed with the mutated cytosolic tail. This suggests that the interaction with COPII and the subsequent incorporation of PHEX in matrix vesicles or other proteins that possesses this motif could be important for mineralization.

INTRODUCTION

PHEX is a type II integral membrane glycoprotein of 749 amino acid residues that exhibits significant homology to members of the M13 family of zinc metallopeptidases (Du, Desbarats et al. 1996; Beck, Soumounou et al. 1997; Lipman, Panda et al. 1998). Structurally, these peptidases are characterized by a short NH₂-terminal cytosolic domain, a single transmembrane segment, and a large extracellular domain that contains the active site of the enzyme (Turner and Tanzawa 1997). Members of the M13 family have been shown to regulate diverse physiological functions such as blood pressure, pain perception and male fertility (Roques, Noble et al. 1993; Turner and Tanzawa 1997; Carpentier, Guillemette et al. 2004).

PHEX physiologic function is still unknown. *In situ* hybridization and immunochemistry studies have revealed that PHEX mRNA and protein are predominantly expressed in osteoblasts and odontoblasts which are the mineralizing cells of bones and teeth, respectively (Ruchon, Marcinkiewicz et al. 1998; Ruchon, Tenenhouse et al. 2000; Miao, Bai et al. 2001; Thompson, Sabbagh et al. 2002). This specific tissue distribution and the relationship between PHEX and the peptidases of the M13 family lead to the hypothesis that PHEX plays a role in the activation or inactivation of peptide factors that are involved in regulating osteoblast differentiation and/or mineralization

(Tenenhouse 1999). However, endogenous PHEX substrates have not yet been identified. In support of a crucial role of PHEX in bone metabolism was the discovery that the PHEX gene is the mutated gene in X-linked hypophosphatemia (1995). XLH is a dominant disorder of phosphate homeostasis, and the most prevalent form of inherited rickets in humans (Tenenhouse and Econs 2001). The disease is characterized by growth retardation, defective bone mineralization, hypophosphatemia secondary to renal phosphate wasting, and an inappropriately normal serum concentration of 1, 25-dihydroxyvitamin D.

To date, more than 175 distinct mutations in the PHEX gene have been reported in patients with XLH (www.phexdb.mcgill.ca). The mutations are scattered throughout the gene and most are consistent with a loss of function of the PHEX protein. The mutations include deletions, splice junction and frameshift mutations, as well as duplications, insertions, and missense and nonsense mutations (Sabbagh, Jones et al. 2000). Expression of several PHEX missense mutations revealed that PHEX loss of function in XLH patients harbouring these mutations could be attributed to protein sequestration in the endoplasmic reticulum, perturbation of endopeptidase activity, and disruption of protein conformation (Sabbagh, Boileau et al. 2001; Sabbagh, Boileau et al. 2003).

One missense mutation (E4Q) identified in an XLH patient is interesting since it is localized to the short 17 amino acid residue cytosolic domain of PHEX. Due to its intracytoplasmic localization, this mutation was not expected to result in endoplasmic reticulum sequestration of the protein nor in loss of enzymatic activity. Interestingly, this mutation occurs in a di-acidic motif (M₁-E-A-E₄-) localized immediately at the N-terminus of PHEX (Du, Desbarats et al. 1996; Beck, Soumounou et al. 1997; Lipman, Panda et al. 1998). A similar di-acidic motif (-D-I-E-), is present in the cytosolic domain of several mammalian transmembrane proteins (Nishimura and Balch 1997). Using the Vesicular Stomatitis Virus G protein as model, it was shown that the di-acidic motif is an important determinant for efficient protein transport from the endoplasmic reticulum, by promoting specific interaction with the COPII coat proteins (Nishimura and Balch 1997; Nishimura, Bannykh et al. 1999). More recently, a similar motif was shown to favour export of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator from the endoplasmic reticulum (Wang, Matteson et al. 2004). In other instances, however, the di-acidic motifs were inefficient as an export signal (Liang, Veeraprame et al. 2004; Robert, Clauser et al. 2005) or were shown to need association with the more common tyrosine-based trafficking motif (Sevier, Weisz et al. 2000; Stockklausner, Ludwig et al. 2001). Since PHEX cytosolic domain does not contain other characterized

targeting motifs, it is thus unclear how mutation E4Q in PHEX cytosolic domain could lead to loss of PHEX function and poor tissue mineralization.

Mineralization of extracellular matrix is a tightly regulated physiological process occurring in bones and teeth and in growth plate cartilage during skeletal growth. The mineralization process is initiated within extracellular matrix vesicles (MVs) (Anderson 1995; Anderson 2003). MVs are membrane-invested particles generated by polarized budding from specific domains of the plasma membrane of chondrocytes, osteoblasts and odontoblasts. These cells are the mineralizing cells in cartilage, bone and dentin, respectively. In bones, MVs are deposited within the newly formed osteoid facing the mineral surface (Morris, Masuhara et al. 1992). Initiation of mineralization is believed to begin with accumulation of Ca^{2+} and PO_4^{3-} within MVs. This process is promoted by virtue of local enrichment of Ca-binding phospholipids and proteins such as annexin II, V and VI, and transmembrane Ca^{2+} channels that favour ingress of calcium ions in MVs (Kirsch, Nah et al. 1997; Kirsch, Harrison et al. 2000; Wang and Kirsch 2002), and of phosphatases such as tissue non-specific alkaline phosphatase (TNAP) (Kirsch, Nah et al. 1997; Hessle, Johnson et al. 2002) and nucleoside triphosphate pyrophosphohydrolase (pyrophosphatase phosphodiesterase 1 (ENPP1; also called plasma cell membrane glycoprotein-1 or PC-1) (Johnson, Moffa et al. 1999; Hessle, Johnson et al. 2002) that generate PO_4^{3-} from phosphate esters.

When sufficient calcium and phosphate has accumulated, calcium phosphate will precipitate ultimately leading to formation of hydroxyapatite crystals. Except for one report showing the importance of a di-leucine motif in the N-terminal cytosolic domain of NPP1 for its cell surface transport (Vaingankar, Fitzpatrick et al. 2004), the molecular mechanisms responsible for directing proteins to MV membrane are still not well understood despite the importance of these structures in tissue mineralization.

In addition, TNAP activity seems to induce the expression of PHEX and inhibit the expression of ENPP1. One could speculate that PHEX can be associated with these proteins in MVs to regulate matrix mineralization (Orimo, Goseki-Sone et al. 2008; Orimo, Goseki-Sone et al. 2008; Orimo and Shimada 2008; Orimo and Shimada 2008).

The present work was undertaken to determine how the E4Q mutation in PHEX could result in loss of protein function. Our results show that the E4Q mutation disrupts the interaction between PHEX cytosolic domain and the COPII proteins, but does not prevent plasma membrane transport of PHEX in HEK 293 cells. However, when the mutant PHEX protein was expressed in MC3T3-E1 cells, commonly used as a cellular model for mineralizing osteoblasts, incorporation of the mutant protein in MVs was greatly reduced,

suggesting that the di-acidic motif is an important determinant for directing proteins to MV membranes.

MATERIAL AND METHODS

Reagents and antibodies

Puromycin, alizarin red, and 5-bromo-4-chloro-3-indolyl P β -D-galactoside were obtained from Sigma (St-Louis, MI, USA). Oligonucleotides were purchased from Invitrogen (Carlsbad, CA, USA). All other reagents were from Sigma, unless where indicated. Anti-ENPP1 was a kind gift from Dr James Goding.

Cells and cell culture

HEK-293 and MG-63 cells (American Type Culture Collection (ATCC) CRL-1573 and CRL-1427, Manassas, VA) were maintained in Dubelcco's Eagle modified medium (Gibco BRL, Burlington, Ontario, Canada) supplemented with 10% FBS (Biocell, Montréal, Québec, Canada), penicillin (50 U/ml), streptomycin (50 μ g/ml), fungizone (125 ng/ml), sodium pyruvate (1mM) and 2mM glutamine at 37°C with 5% CO $_2$. MC3T3-E1 cells (ATCC, CRL-2593) were maintained in alpha-modified essential medium (α -MEM) (Gibco BRL, Burlington, Ontario, Canada) supplemented as above.

DNA constructs and mutagenesis

PHEX missense mutation E4Q was generated by PCR-mutagenesis (Yang, Fourier et al. 1994) and confirmed by DNA sequence analysis. The wild-type and mutated human PHEX cDNAs were subcloned in plasmid pCDNA3 (Invitrogen, Carlsbad, CA), with the RSV promoter, for transfection in mammalian cells.

Chimeric PHEX/NEP cDNAs (see Figure 6) were generated by PCR using appropriate oligonucleotides, and the human wild-type or mutant PHEX cDNA constructed above or human NEP cDNA (Tran-Paterson, Boileau et al. 1990). Purification of PCR-amplified DNA fragments was performed using GFX PCR DNA and gel band purification kit (Amersham Biosciences, Baie-d'Urfé, Québec, Canada). The PCR products were inserted into BamHI and SalI sites of pLPC vector (Mallette, Goumard et al. 2004). Constructs were confirmed by DNA sequence analysis.

Cell transfection and retroviral infection

HEK-293 cells were transfected with cDNAs using the calcium-phosphate coprecipitation method (Sambrook, Fritsch et al. 1989), as previously described (Sabbagh, Boileau et al. 2001). Stable cell populations were selected by culture in 400 µg/ml of G418 (Sigma, St-Louis, MI).

Retroviral particles were produced by transfection of Phoenix packaging cells as previously described (Serrano, Lin et al. 1997). MC3T3-E1 cells were then infected using the spent culture media from transfected Phoenix cells. Infected cell populations were selected by culture in puromycin (2.5 µg/ml).

SDS-PAGE, immunoblotting, endoglycosidase digestion and pulse-chase studies

Expression of PHEX protein was monitored by SDS-PAGE and immunoblotting of cell extracts, as described previously (Ghaddar, Ruchon et al. 2000) using the PHEX-specific monoclonal antibody 13B12 (Enobia Pharma, Montreal, QC). The glycosylation state of the proteins was determined by endoH and PNGaseF digestions as described previously (Ghaddar, Ruchon et al. 2000). Pulse-chase studies were performed on transfected HEK-293 cells in the presence of [³⁵S]methionine as described previously (Benoit, Vargas et al. 2004).

Wild-type-PHEX and E4Q-PHEX activity using Abz-GFSDYK(Dnp)-OH as substrate

HEK-293 cells expressing wild-type PHEX or the E4Q mutant were lysed in 1% n-octyl-D-glucopyranoside for 4 h at 4°C and centrifuged at 13 000 g for 30 min. Protein extracts were used for the assay as described previously

(Campos, Couture et al. 2003). Briefly, 10 μ g of proteins, as determined by Bradford assay (Bio-Rad, Mississauga, Ontario, Canada) and Abz-GFSDYK(Dnp)-OH (Enobia Pharma) at a concentration of 10 μ M were incubated in hydrolysis buffer (10 mM Bis-Tris, 150 mM NaCl, pH 5.5) at 37°C. Fluorescence was monitored every 4 min for a period of 1 h on a Hitachi F-2000 spectrofluorimeter with a 320 nm excitation filter and an emission peak at 430 nm with a passing band of 30 nm. Results were expressed as arbitrary fluorescence units (AFU).

Biotinylation of cell surface proteins

Biotinylation of cell surface proteins was performed on stable transfected HEK-293 cell populations expressing wild-type or E4Q mutant PHEX essentially as described previously (Benoit, Vargas et al. 2004). Protein samples were subjected to SDS/PAGE on a 7.5% gel and analyzed by immunoblotting. First, the blot was probed with the monoclonal antibody 13B12. Then, to rule out the possibility that intracellular proteins could be biotinylated, the blot was stripped and re-probed with a rabbit anti-actin antibody.

Purification of PHEX cytosolic domains and in vitro interaction with the COPII coat proteins

To produce in *E coli* wild-type and E4Q mutated PHEX cytosolic domains, complementary oligonucleotides encoding the whole cytosolic domain were annealed and inserted into the NdeI/SacII-digested pET41(b) vector (Novagen, Madison, WI) in frame with the His tag. His-tagged wild-type or mutant cytosolic domains were produced in *E coli* BL21(DE3) strain according to the manufacturer's protocol (Novagen). The purity of the cytosolic domains was monitored by SDS-PAGE on a 15% gel and Coomassie blue staining.

In vitro interactions were performed with lysates from MG-63 cells. Cells were lysed in lysis buffer (50mM tris-HCl 150 mM NaCl, 2,5 mM MgCl₂, 2,5mM CaCl₂, 0,1% NP-40, pH 7.5) containing a protease inhibitor cocktail (Thompson, Sabbagh et al. 2002) Proteins were then quantified by Bradford. Incubation mixtures containing 50µl of Ni-NTA beads 50%, 1 mg of MG-63 lysates and 5 µg of wild-type or E4Q cytosolic domain were incubated for 1 h at 4°C. Ni-NTA beads were washed 4 times with washing buffer (50 mM Tris-HCl, 1M NaCl, 2,5 mM MgCl₂, 2,5mM CaCl₂, 1% triton X-100, pH 7,5). The beads were resuspended in Laemmli loading buffer and the proteins resolved by SDS-PAGE on a 7.5% gel. The presence of COPII protein was detected by immunoblotting with an anti-COPII antibody (Abcam, Cambridge, MA).

MV isolation and alizarin red staining

MVs were purified from MC3T3-E1 cells as previously described (Johnson, Moffa et al. 1999). Briefly, upon cell confluence, 2.5 mM β -glycerophosphate, 10^{-8} M dexamethasone and 50 μ g/ml ascorbic acid were added to the medium. The medium was replaced every two days for 14 days. At 14 days, the medium was left for 4 days for matrix vesicles accumulation. Medium was then collected and centrifuged at 20 000 g for 20 min at 4°C to remove cellular debris. MVs were then isolated by centrifugation at 100 000 g for 1 h. MVs were resuspended either in 0,4ml of lysis buffer (0.2 M Tris base with 1% triton X-100, 1.6mM MgCl₂, pH8.1), or in NP-40 buffer (0.1M NaCl, 10 mM Tris HCl, 3 mM EDTA, 0.5% NP-40, pH8.1) or in PBS, and concentrated 20 fold using Centricon centrifugal device (Millipore, Bedford, MA).

MVs resuspended in PBS were immunoprecipitated for 16 h at 4°C on a rotating wheel with a polyclonal antibody prepared in rabbit against the ectodomain of PHEX (Dr. A. Adam, Faculté de Pharmacie, Université de Montréal). Seventy five μ l of a 50% Protein A-Sepharose beads (Amersham) suspension was added for 1 h at 4°C. Beads were recovered by centrifugation, washed 5 times in PBS and resuspended also in PBS. Samples were then subjected to SDS-PAGE on a 7.5% gel. Proteins were detected by immunoblotting using anti-PHEX 13B12 (Enobia Pharma), anti-NEP 18B5

(Ruchon, Marcinkiewicz et al. 2000) or anti-ENPP1 (kind gift of Dr J. Goding) antibodies.

Alizarin red staining was performed as described previously. Briefly, the cells were washed twice with PBS, fixed 15 min with 10% formaldehyde and then washed 2 times with H₂O. For quantization, cells were incubated with 800µL of a 10% acetic acid solution for 30 min under gentle shaking. Then, 500µL of the mixture was added to 100µL of 10% NH₄OH. Absorbance was taken at 405 nm using a spectrophotometer.

Quantitative RT-PCR

Changes in PHEX mRNA levels were determined by quantitative RT-PCR on an ABI Prism 7900HT Sequence Detection System according to the manufacturer's recommendation. Total RNA was isolated by Trizol (Invitrogen) and DNase-I-treated (Mississauga, Ontario, Canada), and cDNA was prepared according to the manufacturer's instructions (Invitrogen). Q-PCR reactions were carried out using TaqMan probe-based chemistry (Applied Biosystems, Streetsville, Ontario, Canada). The primer sequences are as follow: PHEX: 5' TCTGAAGCCAGAATGCATAGAA 3' for forward and 5' CTCACAAGGATCCACAGAAAGA 3' for reverse primer. The 18S rRNA Taqman assay (Applied Biosystems) was used as the endogenous control gene.

Relative fold differences were determined by the $\Delta\Delta C_t$ method using the wild-type MC3T3 cells infected with control pLPC vector as the calibrator sample.

RESULTS

Interaction of PHEX cytosolic domain with the COPII coat proteins.

Since the E4Q mutation is localized in a di-acidic motif and since such motifs have been shown to interact with the COPII coat proteins (Nishimura and Balch 1997; Nishimura, Bannykh et al. 1999), we tested the hypothesis that the E4Q-PHEX mutation results in a loss of interaction with the COPII coat proteins. Wild-type and mutant E4Q-PHEX cytosolic tails fused to a His epitope were first produced in bacteria. As showed in figure 1A, the fusion proteins were correctly expressed and purified correctly using Ni-NTA columns. To look for an interaction with the COPII coat proteins, 5 µg of purified cytosolic tails were incubated with 1 mg of MG63 cell extracts. MG63 cells are human osteoblast-like cells shown previously to express PHEX. Protein complexes containing PHEX cytosolic domain were isolated on Ni-NTA columns, washed and analyzed by immunoblotting with an anti-COPII antibody. As seen in figure 1B, two COPII-immunoreactive bands of approximately 85 and 82 kDa are associated with the wild-type, but not with the E4Q mutant cytosolic tail or the pET vector protein. These two bands are also present in the MG63 cell extracts (data not shown). The 82 kDa species is most probably generated by proteolysis of the 85 kDa protein since its relative

intensity varies from one preparation of MG63 cell extract to the other, in spite of the presence of a cocktail of protease inhibitors during preparation of the extracts (results not shown). These results indicate that the E4Q mutation disrupts the interaction of PHEX cytosolic domain with the COPII coat protein.

Biosynthesis of the E4Q-PHEX mutant protein.

Since it has been reported that COPII coat protein can direct intracellular protein transport (Miller, Beilharz et al. 2003; Mossessova, Bickford et al. 2003), we next studied the biosynthesis of wild-type and E4Q-mutant PHEX. Immunoblotting of total extracts of HEK 293 cells transfected with pCDNA3 expression vectors containing either the wild-type PHEX cDNA or its E4Q-mutant version showed the presence of two immunoreactive species with approximate molecular masses of 100 and 95 kDa, respectively, in both the wild-type and mutant extracts (Figure 2A, lanes 1 and 4). Both species were sensitive to treatment with PNGase F (Figure 2A, lanes 3 and 6) but only the 95 kDa species was sensitive to Endo H digestion (Figure 2A, lanes 2 and 5). These results are consistent with our previous observations concerning expression of PHEX in HEK 293 cells (Sabbagh, Boileau et al. 2001; Sabbagh, Boileau et al. 2003), and suggest that the 100 kDa species has travelled through the Golgi and reached the cell surface, whereas the 95 kDa band corresponds to a PHEX species still present in the ER. Consistent with this interpretation,

immunoblotting of extracts of HEK 293 cells expressing PHEX C85R mutant, a mutant PHEX protein shown previously to be retained in the ER due possibly to misfolding (Sabbagh, Boileau et al. 2001), showed only the 95 kDa Endo H-sensitive band (Figure 2A, lanes 7 to 9).

To confirm the presence of wild-type and E4Q mutant PHEX proteins at the plasma membrane, cell surface biotinylation of HEK 293 cells expressing either wild-type, E4Q or C85R mutant PHEX protein was performed. The avidin-bound material contained only the 100 kDa wild-type and E4Q PHEX mutant proteins (Figure 2B, lanes 1 and 2). These species were resistant to Endo H digestion (Figure 2C). In comparison, very little C85R PHEX protein could be detected at the cell surface as noted previously by immunofluorescence (Sabbagh, Boileau et al. 2001). In contrast, the supernatant containing the non-biotinylated material showed only faster migrating species (Figure 2B). These PHEX forms were mostly sensitive to Endo H treatment (Figure 2D). For both, wild-type and E4Q mutant PHEX, more proteins are detected at the cell surface than inside the cells, and the proportion of cell surface to intracellular protein is similar. This indicates that the loss of interaction of E4Q-PHEX with COPII coat protein does not lead to an absence of PHEX expression at the cell surface. When blots were re-probed with an anti-actin antibody, actin was detected only in material not bound to

avidin indicating that biotin did not label intracellular proteins (data not shown).

To determine the rate at which wild-type and E4Q mutant PHEX proteins were transported to the cell surface, we next performed pulse-chase studies of the wild-type, E4Q and C85R PHEX proteins. As reported previously (Sabbagh, Boileau et al. 2001), wild-type PHEX is first synthesized as a core-glycosylated protein of 95 kDa that is then matured into the 100 kDa protein as terminal glycosylation occurs in the Golgi compartments (Figure 3). The 100 kDa protein is apparent after 120 min of chase. In the case of mutant E4Q, the 100 kDa protein is visible after 60 min of chase suggesting that terminal glycosylation and transport occur more rapidly for the mutant protein compared to the wild-type PHEX (Figure 3). As expected, no 100 kDa protein is present in mutant C85R as previously reported (Figure 3) (Sabbagh, Boileau et al. 2001). These data suggest that E4Q mutant PHEX is synthesized and reaches the cell surface as efficiently as the wild-type protein.

Activity of E4Q-PHEX

To rule out the possibility that mutation E4Q results in a loss of PHEX enzymatic activity, we measured the activity of wild-type and E4Q-PHEX mutant towards the synthetic peptide substrate Abz-GFSDYK(Dnp)-OH as described elsewhere (Boileau, Tenenhouse et al. 2001; Campos, Couture et al.

2003). Cells were transfected with either wild-type or E4Q-PHEX and whole cell lysates were prepared. E4Q PHEX mutant proved as efficient as wild-type enzyme to hydrolyze the synthetic peptide Abz-GFSDYK(Dnp)-OH (Figure 4). As positive control, purified sec-PHEX was used (Boileau, Tenenhouse et al. 2001). No activity was detected in the conditions used with mock-transfected cell lysates.

PHEX is present in matrix vesicles produced by mineralizing MC3T3 cells

We next hypothesized that interaction between PHEX cytosolic domain and COPII coat protein is important for PHEX localization to specialized membrane domains. In mineralizing cells, extracellular matrix vesicles (MVs), in which mineralization is initiated, are generated by polarized budding from specialized domains of the plasma membrane (Montessuit, Caverzasio et al. 1991; Stechschulte, Morris et al. 1992). To test this hypothesis, we cultured MC3T3 cells for 18 days in the absence or presence of ascorbic acid and β -glycerophosphate. MC3T3 cells are murine calvarial osteoblasts that differentiate and mineralize in the presence of ascorbic acid and β -glycerophosphate. Mineralization nodules can be visualized by staining the culture with Alizarin Red (Figure 5A). Cells and MVs were isolated from mineralizing and non-mineralizing cells and extracts were probed by immunoblotting for the presence of PHEX. For direct comparison, similar

proportions of cell and MV extracts were analyzed. Cells grown in the absence of ascorbic acid and β -glycerophosphate did not mineralize (Figure 5A) and showed very little PHEX protein which was predominantly associated with the cellular fraction (Figure 5B). In contrast, mineralizing MC3T3 cells showed higher PHEX expression and the protein was mostly associated with the MV fraction (Figure 5B). To control for specificity of protein incorporation into MVs, blots were probed with an antibody against Neprilysin, another peptidase of the M13 family present at the plasma membrane of osteoblasts (Ruchon, Marcinkiewicz et al. 1998; Ruchon, Tenenhouse et al. 2000). Neprilysin was detected in extracts of both non-mineralizing and mineralizing cells but not in MV extracts (Figure 5C).

Several proteins have been associated to MVs. One such protein is ENPP1, a nucleotide triphosphate pyrophosphohydrolase (Johnson, Moffa et al. 1999). We next used PHEX polyclonal antibody to immunoprecipitate MV extracts prepared either in PBS or NP40 and used immunoblotting with anti-ENPP1 antibody to determine whether ENPP1 could be co-immunoprecipitated with PHEX. ENPP1 was detected in both isolation conditions (Figure 5D) indicating that PHEX is present in the same structures as ENPP1. Preimmune serum did not immunoprecipitate ENPP1 (Figure 5D). As expected, when the blot was stripped and probed with the anti-Neprilysin antibody, no Neprilysin was detected (result not shown). These results indicate that PHEX is one of the

proteins present at the cells surface of osteoblasts that are specifically incorporated in MVs of mineralizing cells.

Incorporation of chimeric PHEX/NEP proteins into MVs

To confirm the importance of the di-acidic motif for protein localization to MVs, we generated chimeric proteins composed of NEP transmembrane and extracellular domains, and PHEX wild-type or E4Q mutant cytosolic domain (Figure 6A). In addition, a FLAG epitope was introduced at the carboxy terminus of NEP extracellular domain to distinguish between endogenous NEP protein and the chimeric proteins. Retroviral infection was used to establish stable MC3T3 cell populations expressing the FLAG-tagged proteins.

Cells were cultured for 18 days in the presence of ascorbic acid and β -glycerophosphate and MC3T3 cells expressing NEP-FLAG, WT-NEP-FLAG or E4Q-NEP-FLAG were first checked for expression levels. Immunoblotting of cell extracts with anti-FLAG antibody detected similar amounts of tagged proteins in all cell populations (Figure 6B). MVs were isolated and analyzed by immunoblotting with anti-FLAG antibody. Some NEP-FLAG was detected in MVs isolated from cells expressing this protein (Figure 6C) in contrast to the absence of endogenous NEP in non-infected cells as noticed previously (Figure 5). The presence of NEP-FLAG in MVs may be due to overexpression of the chimeric protein. Replacement of NEP cytosolic domain by that of PHEX

(WT-NEP-FLAG) resulted in massive localization of the tagged chimeric NEP to MVs (Figure 6C). E4Q mutant PHEX cytosolic domain also directed tagged chimeric NEP to MVs but to a much lesser extent than the wild-type PHEX cytosolic domain (Figure 6C). Our results indicate that the di-acidic motif present in PHEX cytosolic domain is important for MV localization, but also suggest that there may be other motifs in PHEX cytosolic domain that also contribute to the incorporation of this enzyme into MVs.

Expression of wild-type PHEX cytosolic tail decreases mineralization in MC3T3 cells.

To confirm that the incorporation of PHEX in MVs is important for mineralization, we designed an experiment to compete the endogenous interaction of PHEX cytosolic tail with COPII proteins in MC3T3 cells. We infected MC3T3 cells with retroviruses expressing either the wild-type or the E4Q PHEX cytosolic tails, and cultured the cells for 18 days in the presence of ascorbic acid and β -glycerophosphate. The mineralization of cells that express the wild-type PHEX cytosolic tail was greatly decreased compared to pLPC expressing or MC3T3 cells as shown by alizarin red staining (Figure 7A). In contrast, expression of E4Q PHEX cytosolic tail resulted in a slight increase in alizarin red staining (Figure 7A).

To determine if this decrease in mineralization was associated with a decrease in PHEX amounts in MVs, we analyzed by immunoblotting MVs purified from the various MC3T3 cultures (Figure 7B). The amounts of PHEX in MVs from cells that overexpress the wild-type cytosolic tail is decreased compared to the MVs from cells that express the pLPC vector alone or MC3T3 control cells. Surprisingly, we observed a large increase of PHEX protein in the MVs of cells that overexpress the mutant cytosolic tail. To determine if this increase of PHEX in MVs from MC3T3 cells expressing the E4Q cytosolic tail was due to increased PHEX production, the experiment was repeated and cells extracts were analyzed by immunoblot to determine the amounts of PHEX protein and by quantitative RT-PCR to evaluate PHEX mRNA levels. A large increase of PHEX protein was also observed in cell lysates (Figure 7D). PHEX mRNA levels were also increased in cells overexpressing the E4Q mutant PHEX cytosolic tail (Figure 7C).

DISCUSSION

PHEX is a transmembrane protein expressed predominantly at the surface of osteoblasts, osteocytes and odontoblasts, where it is involved in the control of the mineralization process (Nesbitt, Coffman et al. 1992). Mutations in the gene encoding PHEX can result in XLH, the most prevalent form of inherited rickets in humans. Most XLH-causing PHEX mutations reported so far are located in the large extracellular domain of the protein and have been shown or predicted to result into loss of protein function either by disrupting PHEX enzymatic activity or by interfering with its cell surface localization. In the present work, we have characterized the biosynthesis and localization of a PHEX protein carrying a mutation (E4Q) in its 17 amino acid cytosolic domain. We show that the E4Q mutation does not interfere with PHEX enzymatic activity or cell surface localization, but rather disrupt the interaction of PHEX with COPII protein and prevent its incorporation into matrix vesicles (MVs).

MVs are deposited on the extracellular matrix by bone forming cells during bone formation and cartilage calcification. Calcium and phosphate accumulate within these MVs leading to the formation of hydroxyapatite the main mineral of bone. Recent proteomic analysis of MVs has identified several proteins present in these structures (Xiao Z, Carnalier CE et al. 2007). PHEX was not one of these proteins. However, we show in this paper that PHEX is also present in MVs. The presence of PHEX was detected in MVs isolated from the

culture medium of mineralizing MC3T3 cells by immunoblotting. Furthermore, when the MV fraction from mineralizing MC3T3 cells was immunoprecipitated with a PHEX antibody, we also detected ENPP1. ENPP1 is one of the best characterized proteins associated with MVs. This interaction could be detected in PBS, the buffer used to resuspend the MVs and in PBS containing 1% NP-40, a non-ionic detergent. In contrast, ENPP1 was not immunoprecipitated with PHEX when MVs were resuspended in PBS containing 1% octylglucoside (results not shown). We conclude that PHEX and ENPP1 may not interact directly, but instead are co-immunoprecipitated by their presence in MVs.

Since PHEX is present in MVs, it is tempting to postulate that PHEX can be specifically incorporated into MVs and that the E4Q mutation impairs this presence into those specific domains on the surface of osteoblasts. We generated chimeric proteins that contain the cytosolic tail of wild-type or E4Q-PHEX combined to NEP, a protein that is not incorporated in MVs. NEP-FLAG, a protein that possess the NEP cytosolic domain, can be observed in MVs. It is possible that the overexpression of those chimeric proteins cause their presence into MVs. With the abundance of the overexpressed proteins, some leaking may occur and hence, their expression in MVs. We showed that the PHEX cytosolic domain is sufficient to drive NEP in MVs. The E4Q-PHEX-NEP-FLAG is also more present than NEP-FLAG but less than WT-

PHEX-NEP-FLAG. This indicates that there may be signals other than the di-acidic motif on the PHEX cytosolic tail that may be important for its presence into MVs. Other signals have been observed to be required for their interaction with COPII (Votsmeier and Gallwitz 2001; Miller, Beilharz et al. 2003; Contreras, Yang et al. 2004). We can postulate that the deletion of such signal would put its level to the same intensity of the NEP-FLAG protein. The PHEX cytosolic tail possesses also a di-lysine motif that is important for the motility of cells as showed with NEP, a member of the PHEX family (Iwase, Shen et al. 2004).

Since PHEX can be incorporated into MVs and that other proteins that are important for mineralization that are incorporated into MVs, such as ENPP1 and that this protein also possesses a di-acidic motif, we hypothesized that the alteration of the incorporation of those proteins into MVs could alter mineralization. We produced WT and E4Q-PHEX cytosolic tails and established stable MC3T3 cell lines that overexpress those cytosolic tails and subjected the cells throughout the mineralization process. We observed that the mineralization of the cells that contain the wild-type cytosolic domain is greatly diminished compared to a slight increase of mineralization for the E4Q PHEX cytosolic tail expressing cells. The two PHEX cytosolic tails can function as a competitive assay for the incorporation of the proteins into MVs. We then assayed the MVs for the presence of endogenous PHEX into MVs. We

observed that endogenous PHEX is reduced into MVs from the cells that over express wild-type PHEX cytosolic tail. Surprisingly, we observed a marked increase of endogenous PHEX in MVs from cells that over express E4Q-PHEX cytosolic tail. It is then possible that the specific COPII pathway is more accessible to endogenous PHEX since the E4Q-PHEX cytosolic tail competes with other proteins in the bulk flow model. The protein that possesses such di-acidic motifs is then taken in charge by the COPII specific pathway and concentrated into MVs. This increase was concomitant with an mRNA increase for the endogenous PHEX protein. Since there is a pool of PHEX inside the cell, probably at the ER level (Miao, Bai et al. 2001), it is possible that the PHEX cytosolic tail can function to retain a potential unknown PHEX transcriptional activator. When PHEX is required to the cell surface, the release of these activators can 1) target more PHEX at the cell surface and 2) increase PHEX protein expression.

We conclude that di-acidic motifs and its interaction with the COPII coat proteins may be important for mineralization in osteoblasts. This interaction contributes to the incorporation of PHEX in matrix vesicles. The E4Q mutation in the PHEX cytosolic tail is enzymatically active and is correctly expressed at the cell surface but is not present in matrix vesicles since its interaction with COPII is lost. We unveil a novel mechanism in which proteins that contain a di-

acidic motif, in cooperation with the COPII coat proteins can affect bone mineralization via bone matrix vesicles.

REFERENCES

- (1995). "A gene (PEX) with homologies to endopeptidases is mutated in patients with X-linked hypophosphatemic rickets. The HYP Consortium." Nat Genet 11(2): 130-6.
- Anderson, H. C. (1995). "Molecular biology of matrix vesicles." Clin Orthop Relat Res(314): 266-80.
- Anderson, H. C. (2003). "Matrix vesicles and calcification." Curr Rheumatol Rep 5(3): 222-6.
- Beck, L., Y. Soumounou, et al. (1997). "Pex/PEX tissue distribution and evidence for a deletion in the 3' region of the Pex gene in X-linked hypophosphatemic mice." J Clin Invest 99(6): 1200-9.
- Benoit, A., M. A. Vargas, et al. (2004). "Endothelin-converting enzyme-like 1 (ECE1) is present both in the plasma membrane and in the endoplasmic reticulum." Biochem J 380(Pt 3): 881-8.
- Campos, M., C. Couture, et al. (2003). "Human recombinant endopeptidase PHEX has a strict S1' specificity for acidic residues and cleaves peptides derived from fibroblast growth factor-23 and matrix extracellular phosphoglycoprotein." Biochem J 373(Pt 1): 271-9.
- Carpentier, M., C. Guillemette, et al. (2004). "Reduced fertility in male mice deficient in the zinc metallopeptidase NL1." Mol Cell Biol 24(10): 4428-37.
- Contreras, I., Y. Yang, et al. (2004). "Sorting signals in the cytosolic tail of plant p24 proteins involved in the interaction with the COPII coat." Plant Cell Physiol 45(12): 1779-86.
- Du, L., M. Desbarats, et al. (1996). "cDNA cloning of the murine Pex gene implicated in X-linked hypophosphatemia and evidence for expression in bone." Genomics 36(1): 22-8.
- Ghaddar, G., A. F. Ruchon, et al. (2000). "Molecular cloning and biochemical characterization of a new mouse testis soluble-zinc-metallopeptidase of the neprilysin family." Biochem J 347(Pt 2): 419-29.
- Hessle, L., K. A. Johnson, et al. (2002). "Tissue-nonspecific alkaline phosphatase and plasma cell membrane glycoprotein-1 are central antagonistic regulators of bone mineralization." Proc Natl Acad Sci U S A 99(14): 9445-9.
- Iwase, A., R. Shen, et al. (2004). "Direct binding of neutral endopeptidase 24.11 to ezrin/radixin/moesin (ERM) proteins competes with the interaction of CD44 with ERM proteins." J Biol Chem 279(12): 11898-905.

- Johnson, K., A. Moffa, et al. (1999). "Matrix vesicle plasma cell membrane glycoprotein-1 regulates mineralization by murine osteoblastic MC3T3 cells." J Bone Miner Res 14(6): 883-92.
- Kirsch, T., G. Harrison, et al. (2000). "The roles of annexins and types II and X collagen in matrix vesicle-mediated mineralization of growth plate cartilage." J Biol Chem 275(45): 35577-83.
- Kirsch, T., H. D. Nah, et al. (1997). "Regulated production of mineralization-competent matrix vesicles in hypertrophic chondrocytes." J Cell Biol 137(5): 1149-60.
- Liang, Z., H. Veeraprame, et al. (2004). "The C-terminus of prenylin is important in forming a dimer conformation necessary for endoplasmic-reticulum-to-Golgi transport." Biochem J 380(Pt 1): 43-9.
- Lipman, M. L., D. Panda, et al. (1998). "Cloning of human PEX cDNA. Expression, subcellular localization, and endopeptidase activity." J Biol Chem 273(22): 13729-37.
- Mallette, F. A., S. Goumard, et al. (2004). "Human fibroblasts require the Rb family of tumor suppressors, but not p53, for PML-induced senescence." Oncogene 23(1): 91-9.
- Miao, D., X. Bai, et al. (2001). "Osteomalacia in hyp mice is associated with abnormal phex expression and with altered bone matrix protein expression and deposition." Endocrinology 142(2): 926-39.
- Miller, E. A., T. H. Beilharz, et al. (2003). "Multiple cargo binding sites on the COPII subunit Sec24p ensure capture of diverse membrane proteins into transport vesicles." Cell 114(4): 497-509.
- Morris, D. C., K. Masuhara, et al. (1992). "Immunolocalization of alkaline phosphatase in osteoblasts and matrix vesicles of human fetal bone." Bone Miner 19(3): 287-98.
- Nishimura, N. and W. E. Balch (1997). "A di-acidic signal required for selective export from the endoplasmic reticulum." Science 277(5325): 556-8.
- Nishimura, N., S. Bannykh, et al. (1999). "A di-acidic (DXE) code directs concentration of cargo during export from the endoplasmic reticulum." J Biol Chem 274(22): 15937-46.
- Orimo, H., M. Goseki-Sone, et al. (2008). "Functional assay of the mutant tissue-nonspecific alkaline phosphatase gene using U2OS osteoblast-like cells." Mol Genet Metab 94(3): 375-81.

- Orimo, H., M. Goseki-Sone, et al. (2008). "Functional assay of the mutant tissue-nonspecific alkaline phosphatase gene using U 2 OS osteoblast-like cells." Mol Genet Metab 94(3): 375-81.
- Orimo, H. and T. Shimada (2008). "The role of tissue-nonspecific alkaline phosphatase in the phosphate-induced activation of alkaline phosphatase and mineralization in SaOS-2 human osteoblast-like cells." Mol Cell Biochem 315(1-2): 51-60.
- Orimo, H. and T. Shimada (2008). "The role of tissue-nonspecific alkaline phosphatase in the phosphate-induced activation of alkaline phosphatase and mineralization in SaOS-2 human osteoblast-like cells." Mol Cell Biochem.
- Robert, J., E. Clauser, et al. (2005). "A novel C-terminal motif is necessary for the export of the vasopressin V1b/V3 receptor to the plasma membrane." J Biol Chem 280(3): 2300-8.
- Roques, B. P., F. Noble, et al. (1993). "Neutral endopeptidase 24.11: structure, inhibition, and experimental and clinical pharmacology." Pharmacol Rev 45(1): 87-146.
- Ruchon, A. F., M. Marcinkiewicz, et al. (2000). "Cellular localization of neprilysin in mouse bone tissue and putative role in hydrolysis of osteogenic peptides." J Bone Miner Res 15(7): 1266-74.
- Ruchon, A. F., M. Marcinkiewicz, et al. (1998). "Pex mRNA is localized in developing mouse osteoblasts and odontoblasts." J Histochem Cytochem 46(4): 459-68.
- Ruchon, A. F., H. S. Tenenhouse, et al. (2000). "Developmental expression and tissue distribution of Phex protein: effect of the Hyp mutation and relationship to bone markers." J Bone Miner Res 15(8): 1440-50.
- Sabbagh, Y., G. Boileau, et al. (2003). "Structure and function of disease-causing missense mutations in the PHEX gene." J Clin Endocrinol Metab 88(5): 2213-22.
- Sabbagh, Y., G. Boileau, et al. (2001). "Disease-causing missense mutations in the PHEX gene interfere with membrane targeting of the recombinant protein." Hum Mol Genet 10(15): 1539-46.
- Sabbagh, Y., A. O. Jones, et al. (2000). "PHEXdb, a locus-specific database for mutations causing X-linked hypophosphatemia." Hum Mutat 16(1): 1-6.
- Sambrook, J., E. F. Fritsch, et al. (1989). Molecular cloning : a laboratory manual. Cold Spring Harbor, N.Y., Cold Spring Harbor Laboratory.

- Serrano, M., A. W. Lin, et al. (1997). "Oncogenic ras provokes premature cell senescence associated with accumulation of p53 and p16INK4a." Cell 88(5): 593-602.
- Sevier, C. S., O. A. Weisz, et al. (2000). "Efficient export of the vesicular stomatitis virus G protein from the endoplasmic reticulum requires a signal in the cytoplasmic tail that includes both tyrosine-based and di-acidic motifs." Mol Biol Cell 11(1): 13-22.
- Stockklausner, C., J. Ludwig, et al. (2001). "A sequence motif responsible for ER export and surface expression of Kir2.0 inward rectifier K(+) channels." FEBS Lett 493(2-3): 129-33.
- Tenenhouse, H. S. (1999). "X-linked hypophosphataemia: a homologous disorder in humans and mice." Nephrol Dial Transplant 14(2): 333-41.
- Tenenhouse, H. S. and M. J. Econs (2001). Mendelian hypophosphatasias. New York, McGraw Hill Book Co.
- Thompson, D. L., Y. Sabbagh, et al. (2002). "Ontogeny of Phex/PHEX protein expression in mouse embryo and subcellular localization in osteoblasts." J Bone Miner Res 17(2): 311-20.
- Tran-Paterson, R., G. Boileau, et al. (1990). "Comparative levels of CALLA/neutral endopeptidase on normal granulocytes, leukemic cells, and transfected COS-1 cells." Blood 76(4): 775-82.
- Turner, A. J. and K. Tanzawa (1997). "Mammalian membrane metalloproteinases: NEP, ECE, KELL, and PEX." Faseb J 11(5): 355-64.
- Vaingankar, S. M., T. A. Fitzpatrick, et al. (2004). "Subcellular targeting and function of osteoblast nucleotide pyrophosphatase phosphodiesterase 1." Am J Physiol Cell Physiol 286(5): C1177-87.
- Votsmeier, C. and D. Gallwitz (2001). "An acidic sequence of a putative yeast Golgi membrane protein binds COPII and facilitates ER export." Embo J 20(23): 6742-50.
- Wang, W. and T. Kirsch (2002). "Retinoic acid stimulates annexin-mediated growth plate chondrocyte mineralization." J Cell Biol 157(6): 1061-9.
- Wang, X., J. Matteson, et al. (2004). "COPII-dependent export of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator from the ER uses a di-acidic exit code." J Cell Biol 167(1): 65-74.
- Yang, X.-F., H. Fourier, et al. (1994). "Site-directed mutagenesis and transfection methods in the study of prohormone processing. ." Neuroprotocols 5: 157-168.

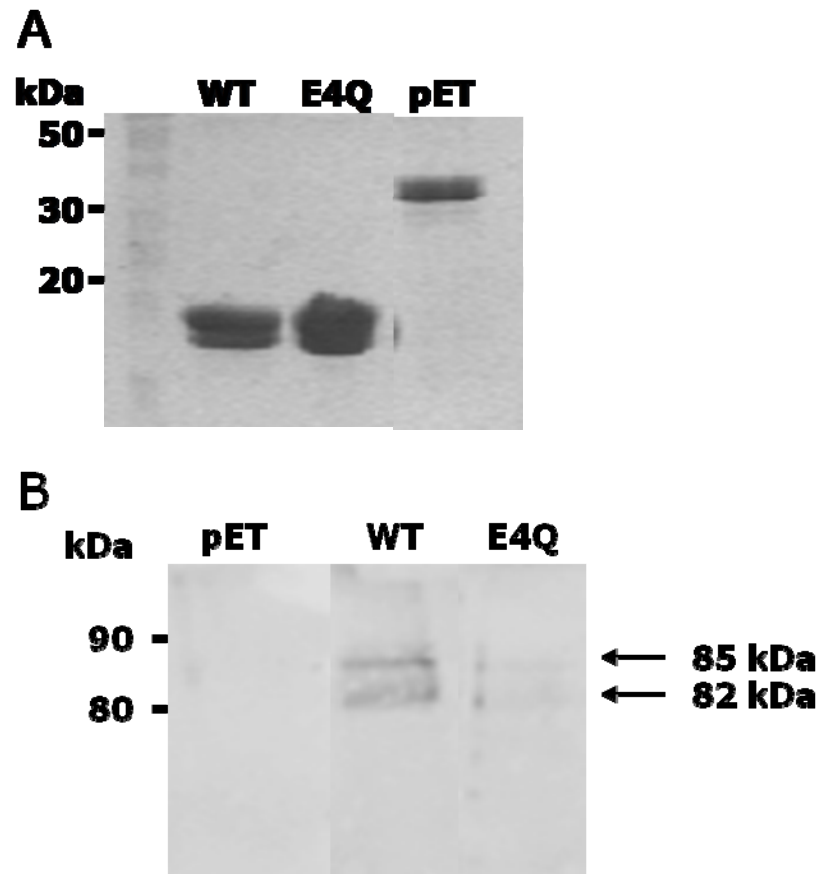


Figure 1: Interaction of wild-type and E4Q mutant with the COPII coat proteins. A) Western blot using an anti- $_6$ His antibody for the detection of the wild-type and E4Q cytosolic tails or empty vector. B) MG63 cells extracts were incubated with the purified cytosolic tails of wild-type, E4Q-PHEX or pET empty vector and the proteins that bound to those tails were migrated on a polyacrylamide gel and revealed by western blotting using an antibody against COPII coat proteins.

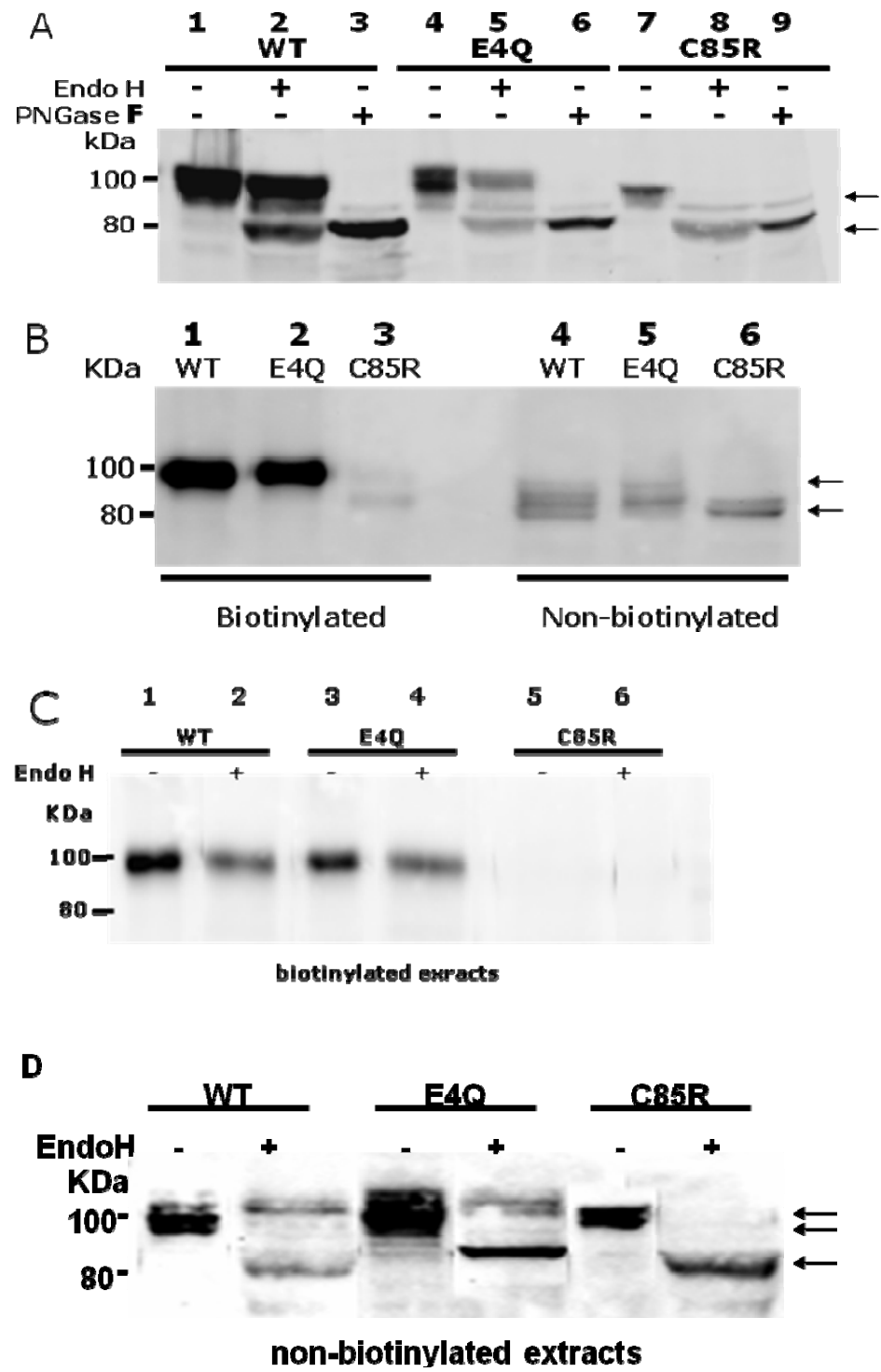


Figure 2: PHEX mutant E4Q is expressed normally and resistant to Endo H digestion.

A) HEK 293 cells were lysed and the proteins extracted as described in material and methods. The extracts were treated with PNGase F or Endo H and 50µg of protein were resolved on a 7.5% polyacrylamide gel. PHEX protein was revealed using the anti-PHEX 13B12 monoclonal antibody. B) Stably transfected HEK 293 cells were incubated with NHS-SS-biotin and lysed. Biotin-labelled proteins were separated from unlabelled proteins by incubating NeutrAvidin resin. Wild-type, E4Q and C85R PHEX protein present in the pellet and the supernatant were detected by immunoblotting using an anti-PHEX antibody after migration on a 7.5% acrylamide gel. C) Biotinylated and non-biotinylated extracts (D) were subjected to EndoH digestion and proteins were resolved on a 7.5% polyacrylamide gel.

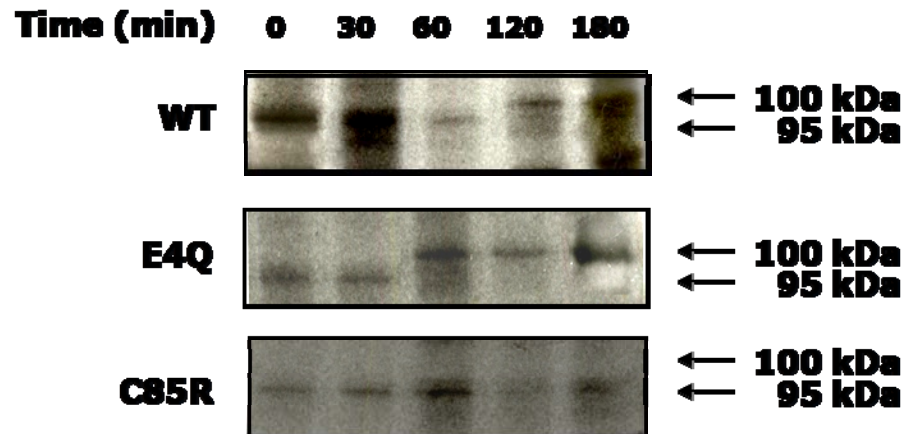


Figure 3: Biosynthesis and processing of wild-type and mutant PHEX proteins.

HEK 293 cells transfected with wild-type and mutant PHEX cDNAs were pulsed for 30 min with [³⁵S] methionine and chased with unlabelled methionine for the times indicated. Cells lysates were subjected to immunoprecipitation with a PHEX polyclonal antibody and analysed by SDS-PAGE and fluorography. Arrows indicate the core and fully-glycosylated forms of the protein, the fully glycosylated protein being the more slowly migrating band.

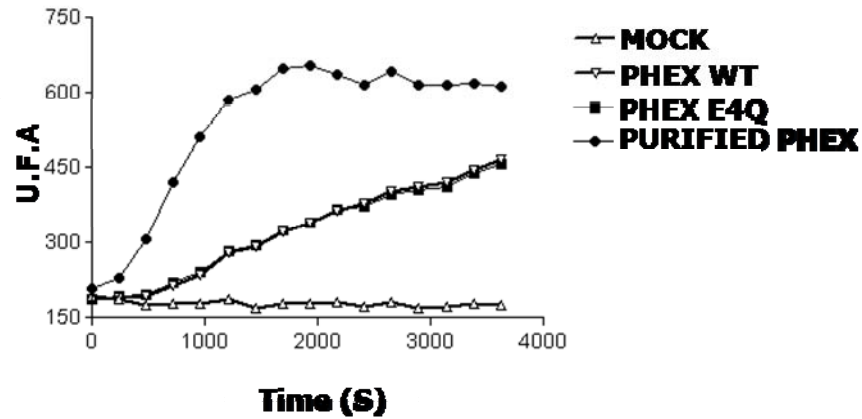


Figure 4: Hydrolysis of Abz-GFSDYK(Dnp)-OH by WT and E4Q PHEX.

HEK 293 cells were lysed and 10 μ g of cell extract were used for the assay. Cell extracts were incubated with Abz-GFSDYK(Dnp)-OH at a concentration of 10 μ M as described in material and methods. Fluorescence was assayed every 4 minutes for a 1 hour period. Wild-type and E4Q-PHEX activity was measured. Mock transfected cells to which 500 ng of sec-PHEX was added was also measured.

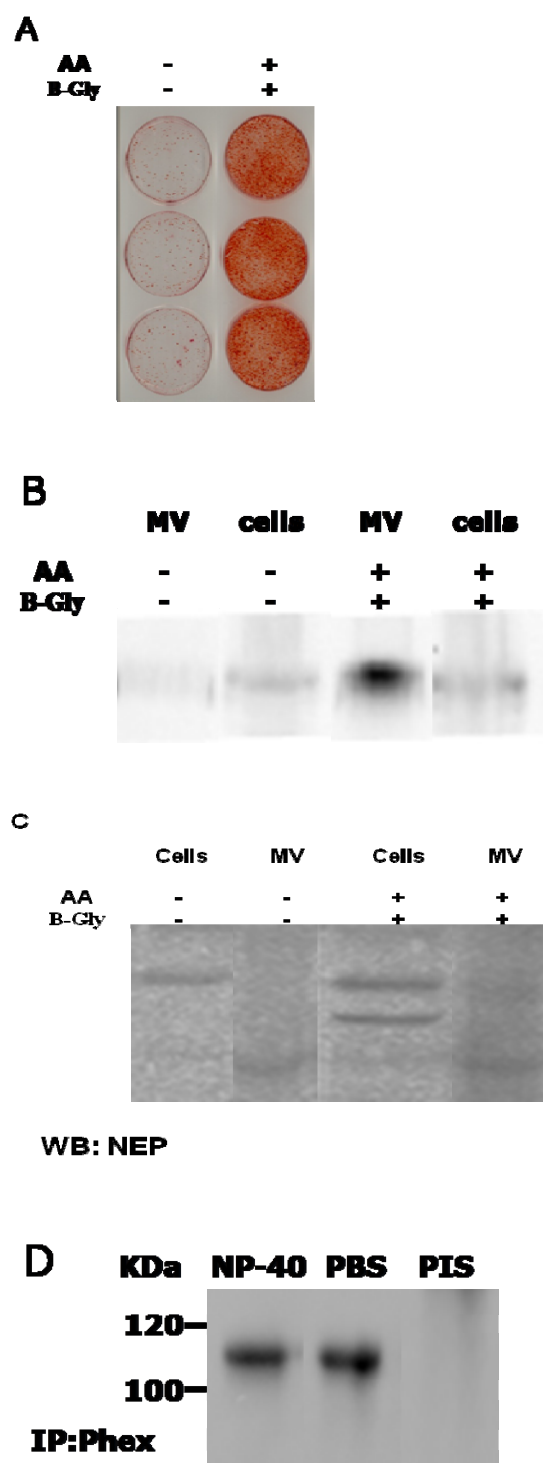


Figure 5: PHEX is present in matrix vesicles.

Mineralized MC3T3 cells were subjected to Alizarin red staining after 14 days by the addition at day 1 of ascorbic acid and beta- glycerophosphate. The conditioned media from mineralizing or non-mineralizing MC3T3 cells from day 14 to 18 was collected, the matrix vesicles isolated and then concentrated 20 fold using a microcon centrifugal device and resuspended in lysis buffer, as described in material and methods. Equal proportions of protein from whole cell extracts and from MVs were separated on an SDS-PAGE gel and probed with an anti-PHEX (B) or anti-NEP (C) antibodies. Next, MVs were immunoprecipitated in PBS or NP-40 buffer using an anti-PHEX polyclonal antibody and subjected to immunoblotting using an anti-PC1 (D) to detect this protein in matrix vesicles.

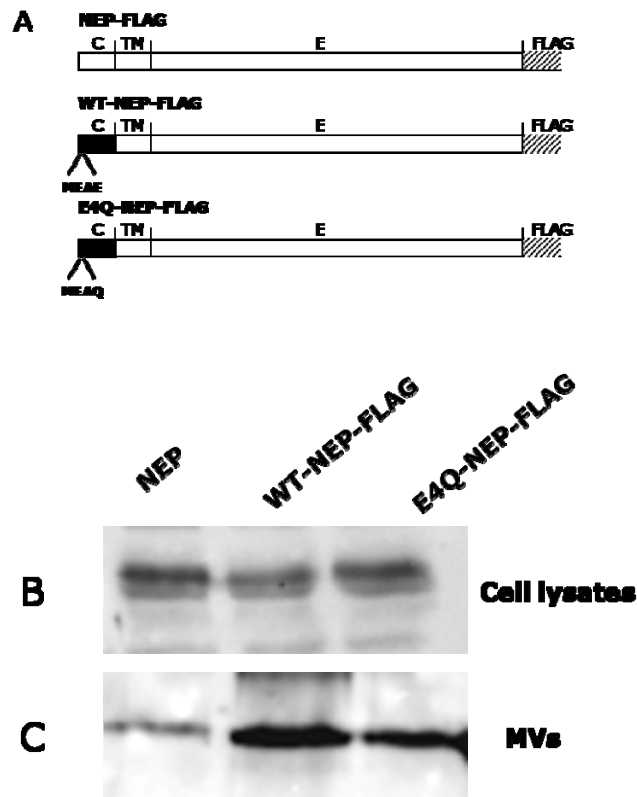


Figure 6: Incorporation of chimeric PHEX/NEP proteins in MVs.

Stably infected MC3T3 cells expressing either NEP-FLAG, WT-PHEX-NEP-FLAG or E4Q-PHEX-NEP-FLAG were subjected to mineralization and MVs were isolated. A) Schematic representation of the various constructions where black boxes represent PHEX domains, white boxes for NEP, C for cytosolic domain, TM for transmembrane domain and E for extracellular domain. MVs were isolated and separated on a polyacrylamide gel and probed with an anti-FLAG antibody in cell lysates (B) or matrix vesicles isolated from mineralizing MC3T3 cells (C).

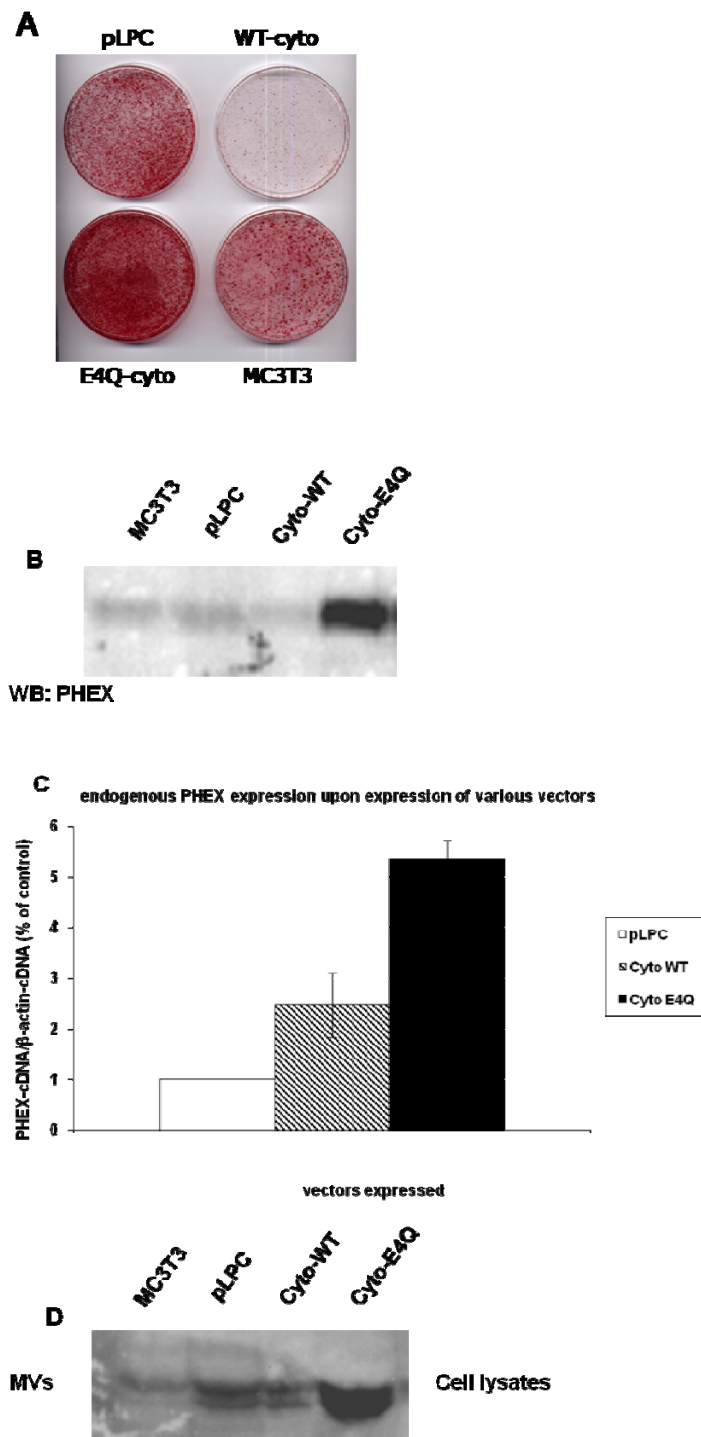


Figure 7: Expression of wild-type PHEX cytosolic tail decreases mineralization in MC3T3 cells.

Alizarin red staining was performed on mineralized MC3T3 cells expressing wild-type and E4Q mutant PHEX cytosolic tails (A). Stably infected MC3T3 cells expressing either wild-type or E4Q mutant PHEX cytosolic tails were subjected to mineralization and MVs were isolated. To detect the amount of endogenous PHEX in these cells, MVs were separated on a polyacrylamide gel and probed with an anti-PHEX antibody (B). Quantitative RT-PCR and Western blots were performed on cell extracts to look at PHEX at the mRNA or protein under the same conditions (C,D).

Chapitre 4 – Article: Overexpression of FGF23 impairs mineralization in MC3T3 cells via a senescence pathway.

Mise en contexte

FGF23 est une protéine importante pour le métabolisme du phosphate. Quelques maladies chez les humains ont démontré son importance comme XLH, TIO ou ADHR. Les patients souffrant de ces maladies présentent comme résultante commune une expression accrue de FGF23, cette expression causant une diminution de la réabsorption du phosphate circulant par le rein. De plus, FGF23 a été montré comme pouvant interagir avec Klotho, une protéine impliquée dans le phénomène de sénescence, klotho étant aussi nécessaire à la liaison de FGF23 à son récepteur.

La présente étude permet de mettre en évidence que la surexpression de la protéine FGF23 dans les cellules MC3T3 cause une différenciation prématurée des ostéoblastes. Cette affirmation est observée par des essais de minéralisation des cellules MC3T3. Cette différenciation prématurée s'accompagne d'un phénotype de sénescence lorsque FGF23 est surexprimée. De plus, nous avons observé une régulation anormale de gènes associés aux processus de différenciation, minéralisation et sénescence des ostéoblastes.

Cet article est en préparation pour soumission dans la revue *Journal of Bone and Mineral Research*.

Note : Contribution(s) des auteurs

MSL : Culture cellulaire et infections, essais de minéralisation, immunobuvardages, construction des protéines chimériques, RT-PCR, participation à l'écriture du manuscrit.

VB : Biologie moléculaire et construction des protéines chimériques, essais de minéralisation, essais de prolifération, essais de sénescence.

GB : Supervision générale et écriture du manuscrit.

Overexpression of FGF23 impairs mineralization in MC3T3 cells via a senescence pathway.

Mathieu St-Louis¹, Véronique Bériault¹ and Guy Boileau¹

1) Département de Biochimie; Université de Montréal; C.P. 6128, Succ. Centre-Ville, Montréal, Québec, H3C 3J7; Canada

Keywords: FGF23, mineralization, MC3T3, senescence, differentiation

Guy Boileau, PhD
Université de Montréal
Département de Biochimie, E-521
C.P. 6128, Succ. Centre-ville
Montréal, Qc, H3C 3J7
Phone 514-343-6328
Fax 514-343-2210

Abstract

FGF23 is a protein that is expressed predominantly in osteoblasts and osteocytes. FGF23 has been shown to play a role in phosphate reabsorption by decreasing Pi levels as a consequence of a reduction in the expression of sodium-cotransporter IIa (NaPi2a) at the brush border membrane of renal proximal tubule cells. FGF23 has also been linked with the mineralization process. Mice overexpressing FGF23 displays growth retardation and osteomalacia for example. Defective expression levels of FGF23 are observed as a consequence of several disease related to hypophosphatemia such as ADHR, OHO and XLH. The purpose of this study was to evaluate the mineralization process by stably transfected MC3T3 overexpressing FGF23. Our results show that the mineralization onset is accelerated in MC3T3 cells overexpressing FGF23. This earlier mineralization onset is not due to a different proliferation rate from WT cells vs FGF23 expressing cells. We then observed that FGF23 overexpressing cells showed an increase in the senescence phenotype compared to WT cells. We also observed a different regulation of genes implicated in the differentiation, mineralization and senescence processes. This could indicate that the rapid differentiation process observed in cells overexpressing FGF23 is leading to a premature senescent subset of cells. These cells, where FGF23 levels are high, could in turn lead to bone defects as

observed in several diseases where expression of FGF23 are high such as ADHR, TIO and XLH.

INTRODUCTION

Bone formation is a tightly regulated physiological process controlled by several hormones and local factors. Recently, genetic evidence from autosomal dominant hypophosphatemic rickets (ADHR), a human metabolic bone disease, has underscored the important roles of fibroblast growth factor (FGF)-23 in bone mineralization (2000). Mutations in the FGF23 gene are responsible for ADHR. FGF23 is a 251 amino acid residue protein (\approx 32 kDa) with an N-terminal region harboring the FGF homology domain and a novel 71 amino acid residue peptide at the C-terminus(Shimada, Mizutani et al. 2001). The N-terminus FGF homology domain is separated from the novel C-terminus peptide by a consensus sequence for cleavage by subtilisin/kexin proprotein convertases, and mutations in this sequence result in ADHR (2000). The mutations prevent cleavage by the proprotein convertases and prolong FGF23 activity (White, Carn et al. 2001; Bai, Miao et al. 2003).

FGF23 is most highly expressed in normal bones (Liu, Guo et al. 2003; Mirams, Robinson et al. 2004; Yoshiko, Wang et al. 2007). In trabecular bone, *in situ* hybridization identified FGF23 in osteocytes and flattened bone-lining cells. Osteoblasts lining bone surfaces in actively remodeling bones were also labeled. Recently, Liu and co-workers have established a mouse model in which the FGF23 promoter drives expression of the green fluorescent protein

(GFP) (Liu, Zhou et al. 2006). Sites of FGF23 expression can then be directly seen by the fluorescent signal due to GFP. This study confirms that bone is the site where FGF23 expression is the strongest, and identifies the osteocytes as the predominant cell expressing FGF23.

The role of FGF23 in phosphate homeostasis and vitamin D metabolism is well documented. Animals injected with recombinant FGF23 or bearing CHO cells expressing FGF23 experienced hypophosphatemia due to decreased expression of the kidney Npt2a sodium-phosphate co-transporter localized to the apical membrane of the proximal tubule (Shimada, Mizutani et al. 2001; Saito, Kusano et al. 2003). These animals also showed a rapid decrease in circulating levels of vitamin D due to suppressed $1\alpha(\text{OH})\text{ase}$ expression. These effects were stronger when FGF23 mutants identified in ADHR patients were used (Bai, Miao et al. 2003; Segawa, Kawakami et al. 2003). Over expression of FGF23 in transgenic mice (Larsson, Marsell et al. 2004) or gene ablation (Shimada, Kakitani et al. 2004) confirmed these initial observations that FGF23 acts at the kidney level to regulate phosphate reabsorption and vitamin D metabolism. High expression of FGF23 is also the cause for the hypophosphatemia in other diseases. Mutations in the PHEX protein cause an increase in FGF23 expression in XLH and some tumors causing

hypophosphatemia have been shown to express high levels of FGF23 (Liu, Guo et al. 2003; Ward, Rauch et al. 2004)

The role of FGF23 in skeletal biology is less well understood. FGF23 transgenic mice do present skeletal phenotypes that include growth retardation, a disorganized growth plate, and osteomalacia in addition to the renal phenotype reported above (Larsson, Marsell et al. 2004). Some of these skeletal manifestations are the consequence of the systemic effects of FGF23 on serum biochemistry and in particular on serum phosphate levels. However, hypophosphatemia alone does not explain all skeletal phenotypes observations. For example, Npt2a knock-out animals are hypophosphatemic but do not develop osteomalacia (Beck, Karaplis et al. 1998). This suggests that FGF23 has a direct action on bone cells in addition to its systemic effects. A recent study examining the effects of FGF23 on cultured rat calvaria cells and bone explants supports this hypothesis (Wang, Yoshiko et al. 2008).

In the present study, we evaluated the effect of overexpression of FGF23 on bone mineralization using cultured MC3T3 osteoblasts. We found that FGF23 overexpression stimulates osteoblast expression of genes involved in mineralization and apparition of mineralized nodules. This increase in mineralization is not due to an increase in the osteoblasts proliferation rate. We also observed that overexpression of FGF23 induces a senescence phenotype on MC3T3 cells.

MATERIAL AND METHODS

Reagents and antibodies

Puromycin, alizarin red, 5-bromo-4-chloro-3-indolyl P3-D-galactoside, crystal violet, were obtained from Sigma (St-Louis, MI, USA). Oligonucleotides were purchased from Invitrogen (Carlsbad, CA, USA). All other reagents were from Sigma, unless where indicated. Anti-Flag M2 was obtained from Sigma.

Cells and cell culture

MC3T3 cells (CRL-2593, American Type Culture Collection (ATCC), Mannassas, VA, USA) were maintained in alpha-modified essential medium (α -MEM) (Gibco BRL, Burlington, Ontario, Canada) supplemented with 10% FBS, (Biocell, Montréal, Québec, Canada), penicillin (50 U/ml), streptomycin (50 μ g/ml), fungizone (125 ng/ml), sodium pyruvate (1mM) and 2mM glutamine at 37°C (Gibco) with 5% CO₂.

DNA constructs

To overexpress FGF23 in MC3T3 cells, we obtained, by PCR, a FGF23 cDNA from total RNA extracted from MC3T3-E1 cells (ATCC). FGF23 cDNA

was cloned using *HindIII* and *XhoI* sites in pLPC vector (a kind gift from Dr. G. Ferbeyre, Université de Montréal, Canada (Serrano, Lin et al. 1997)), downstream the cytomegalovirus promoter with or without fusing a FLAG epitope at the 3' end of the construct.

Retroviral infection

Retroviral particles were produced by transfection of Phoenix packaging cells as previously described (Serrano, Lin et al. 1997). MC3T3 cells were then infected using the spent culture media from transfected Phoenix cells. Infected MC3T3 cell populations were selected by culture in puromycin (2.5 µg/ml) and maintained in puromycin for the experiments.

Western blotting

MC3T3 cells were washed twice with PBS and resuspended by scrapping in 0.5ml PBS containing 1% n-octylglucoside. The cell suspension was incubated at 4°C for 4 h on a rotating wheel and finally centrifuged at 13 000 rpm for 30 min at 4°C. Medium was also collected and centrifuged at 20 000 g for 20 min at 4°C to remove cellular debris. Medium was concentrated 20 fold using Centricon centrifugal device (Millipore, Bedford, MA). Quantitation was made using the DC protein assay kit (Biorad, Mississauga, ON, Canada). For protein analysis, 50 µg of protein were resolved by SDS-PAGE on a 7,5% gel, transferred to a nitrocellulose membrane and immunodetected with the FLAG M2 monoclonal antibody (Sigma). The

protein/antibody complex was revealed by chemiluminescence using the Western lightning kit (Perkin Elmer Life Sciences, Boston, MA, U.S.A.).

Cell proliferation assays

For proliferation assays, two methods were used. First, cells were plated in 12 well-plates at twenty thousand cells per well and cultured for 8 days. The cells were rinsed with PBS and 200 μ l of 0.25% trypsin (Gibco) was added. The cells were harvested by adding 800 μ l of α -MEM medium for a total of 1ml. The cells were counted at times indicated. Second, twenty thousand cells per well were plated into 12-well plates. At the indicated times, cells were washed 3 times with PBS, fixed in 1% glutaraldehyde for 10 minutes at 4°C and rinsed 3 times with PBS. Cells were stained with 0.1% crystal violet for 30 min, rinsed extensively, and dried. Cell-associated dye was extracted with 100 μ l of 10% acetic acid for 15 minutes. Aliquots were transferred to 96-well microtiter plates, and the optical density at 590 nm was determined. Values were normalized to the optical density at day 0 for the appropriate cell type. Within an experiment, each point was determined in triplicate; each growth curve was performed at least twice.

Mineralization assays and alizarin red staining

MC3T3 cells were plated at a density of 500 000 cells per 60 mm Petri dishes. Upon cell confluence, 2.5 mM β -glycerophosphate, 10^{-8} M dexamethasone and 50 μ g/ml ascorbic acid were added to the medium. The medium was replaced every two days for the times indicated.

Alizarin red staining was performed as described previously (Gregory, Gunn et al. 2004). Briefly, the cells were washed twice with PBS, fixed 15 minutes with 10% formaldehyde and the washed 2 times with H₂O. For quantification, cells were incubated with 800 μ L of a 10% acetic acid solution for 30 minutes under gentle shaking. 500 μ L of the mixture was added to 100 μ L of 10% NH₄OH. Absorbance was taken at 405 nm using a spectrophotometer and represented as μ g of ARS per cm².

Senescence- associated β -Galactosidase (SA- β -gal) staining

Cells were plated in 12 well plates at 20 000 cells per well. Upon reaching confluence, cells were washed in PBS, fixed for 3-5 minutes at room temperature in 2% formaldehyde, washed, and incubated at 37°C with fresh senescence associated (3-Gal (SA-,3-Gal) stain solution: 1 mg of 5-bromo-4-chloro-3-indolyl P3-D-galactoside (X-Gal) per ml (stock = 20mg of dimethylformamide per ml), 40 mM citric acid/sodiumphosphate, pH 6.0, 5

mM potassium ferrocyanide, 5 mM potassium ferricyanide, 150 mM NaCl, 2 mM MgCl₂. Staining was evident in 2-4 hr and maximal in 12-16 hours.

Alkaline phosphatase activity

Alkaline phosphatase activity was determined by the alkaline phosphatase kit from Sigma according to the manufacturer's protocol at times indicated. Cells were resuspended in buffer A (10 mM Tris, 5 mM EDTA, 10 mM MgCl₂, 0,1% Triton X-100, 2 µg/ml aprotinin, 2 µg/ml leupeptin, 100 µg/ml PMSF) and sonicated 2 times for 30 seconds. 10 µl of protein extract was mixed with 50 µl of 4 mg/ml of p-nitrophenyl phosphate with 50 µl of alkaline buffer solution (Sigma). The reaction was allowed to run for 15 minutes and stopped with the addition of 100 µl of 1M NaOH. The OD was determined at 410 nm and the results presented as nmol of pNpp per minute.

Quantitative RT-PCR

Changes in (FAS, MMP3, FGF23, FGFR2C, FGFR3C, Osterix, RUNX2 and Colla1) mRNA levels were determined by quantitative RT-PCR on an ABI Prism 7900HT Sequence Detection System according to the manufacturer's recommendation. Total RNA was isolated by Trizol (Invitrogen) and DNase-I-treated (Mississauga, Ontario, Canada), and cDNA was prepared according to the manufacturer's instructions (Invitrogen). Q-PCR reactions were

carried out using TaqMan probe-based chemistry (Applied Biosystems, Streetsville, Ontario, Canada). The primer sequences are listed in table I. The 18S rRNA Taqman assay (Applied Biosystems) was used as the endogenous control gene. Relative fold differences were determined by the $\Delta\Delta C_t$ method using the wild-type MC3T3 cells infected with control pLPC vector as the calibrator sample.

RESULTS AND DISCUSSION

Expression of FGF23 and FGF23/FLAG in MC3T3 cells.

To evaluate the effects of FGF23 on MC3T3 cell cultures, we used retroviral vectors to establish MC3T3 stable cell pools expressing FGF23 and a form of FGF23 carrying a FLAG epitope at its C-terminus (FGF23/FLAG). Immunoblotting with a FLAG-directed antibody of extracts and spent culture media of infected cells showed the presence of a band of approximately 32 kDa in the extract and culture medium of cells expressing FGF23/FLAG but not in the extracts or culture media of control-infected cells or cells expressing FGF23, as expected (Fig. 1). This 32 kDa band corresponds to mature unprocessed FGF23/FLAG as shown previously for FGF23 (Larsson, Davis et al. 2005). In addition to the 32 kDa species, a 12 kDa band is observed in the culture medium of cells expressing FGF23/FLAG (Fig. 1). The Mr of this species is consistent with the Mr of the C-terminal fragment of FGF23 carrying the FLAG epitope (Larsson, Davis et al. 2005). The cells continued to express FGF23/FLAG after several passages (data not shown). Since we obtained evidence of expression and processing of FGF23/FLAG from the viral vector, this construct was used in subsequent experiments.

Overexpression of FGF23 does not affect proliferation.

FGF23 has been shown to bind to several isoforms of the FGF receptors (FGFR) (Yamashita, Konishi et al. 2002; Baum, Schiavi et al. 2005; Yu, Ibrahim et al. 2005; Kurosaki, Ogawa et al. 2006). Since activation of these receptors can affect bone cell proliferation (Iwata, Chen et al. 2000; Yu, Xu et al. 2003), we first determined whether overexpression of FGF23/FLAG affected proliferation of MC3T3 cells. No difference in the proliferation state of MC3T3 cells overexpressing FGF23/FLAG was observed compared to pLPC-infected cells (Fig. 2A and 2B). All cell pools showed approximately the same number of cells after 8 days of culture and crystal violet staining, an indicator of cells proliferation, also showed no difference between FGF23/FLAG-infected cells and pLPC-infected MC3T3 cells (Fig. 2A and 2B).

Expression of marker genes in MC3T3 cells overexpressing FGF23.

To determine the function of FGF23 in MC3T3 cells, we analyzed the expression of gene markers for differentiation (Col1a1, RUNX2 and osterix), mineralization (PHEX and MMP3) and apoptosis (Fas) in control and MC3T3 cells expressing FGF23/FLAG cultured in mineralizing conditions. In addition to these gene markers, we also monitored the expression of FGF23 from the viral promoter and of the FGF23 receptors FGFR2c and FGFR3c during the course of the 28 day culture period. Little expression of FGF23/FLAG from the

viral vector can be detected before day 11. After day 11, there is an increase in FGF23/FLAG mRNA expression until day 21. This is surprising since FGF23/FLAG is under the control of the CMV promoter which is usually insensitive to the differentiation pattern of the cell. This little expression of FGF23/FLAG during the early days of culture may explain the lack of effect observed on the expression of differentiation markers such as *Colla1*, *osterix* and *RUNX2* (Figure 3) in opposition to previous reports in the literature which showed inhibition of differentiation of primary osteoblast in culture in the presence of FGF23 (Wang, Yoshiko et al. 2008). At later days, we observed increased expression of markers of osteoblast mineralization activity such as *PHEX* and *MMP3* in the presence of FGF23/FLAG (Figure 3). We also observed a decrease at day 28 in the level of expression of *Fas*, an apoptosis marker (Brunner, Mogil et al. 1995; Ju, Panka et al. 1995). No changes were observed in the relative expression levels of *FGFR2C* and *FGFR3C*, two receptors used by FGF23 (Baum, Schiavi et al. 2005; Yu, Ibrahimi et al. 2005).

MC3T3 cells expressing FGF23/FLAG display early mineralization.

To evaluate the effects of FGF23/FLAG on MC3T3 cells, WT MC3T3 cells, pLPC-infected cells and pLPC-FGF23/FLAG-infected cells were cultured for 21 days in the presence of ascorbic acid and β -glycerophosphate. The cell differentiation process and mineralization activity were monitored by measuring alkaline phosphatase activity and staining with Alizarin red,

respectively. Overexpression of FGF23/FLAG in MC3T3 cells induced early mineralization as compared to pLPC-infected MC3T3 cells (Fig. 4A). Mineralization is readily visible at day 15 in cells overexpressing FGF23/FLAG whereas mineralization is observed only at day 18 in control cells. Quantification of the Alizarin red stain associated with the different cultures confirmed the visual evaluation of the mineralization process (Fig. 4B). Consistent with the early mineralization activity in cells overexpressing FGF23/FLAG, we measured, for this culture, higher levels of alkaline phosphatase activity in the early days of culture, (Fig. 4C). At the end of the culture period (day 21) however, control and FGF23/FLAG-expressing cells showed the same level of mineralization (Fig. 4A and 4B). Alkaline phosphatase activity stayed however higher for the cells overexpressing FGF23/FLAG (Fig. 4C).

FGF23 overexpression induces senescence in MC3T3 cells.

We next determined if overexpression FGF23/FLAG can induce senescence on MC3T3 cells by staining confluent cell cultures for the presence of senescence-specific β -galactosidase (Fig. 5A). WT and pLPC-infected MC3T3 cells showed a slight positive β -galactosidase staining with 4,67 and 10 % of cells labeled, respectively, whereas FGF23/FLAG-expressing cells showed 32,33% of positive cells (Fig. 5B).

FGF23 has been shown to be overexpressed in several human diseases including XLH, ADHR and OHO (2000; Shimada, Mizutani et al. 2001; Liu, Guo et al. 2003), and has been proposed to negatively affect osteoblast biology. The experiments presented in this paper were designed to study the effect of FGF23 on proliferation, differentiation and matrix mineralization by MC3T3 cells, an accepted model of osteoblastic cells (Wang, Christensen et al. 1999). Our data show that the expression of FGF23 does not affect proliferation of the cells in accordance with previous published results obtained with primary osteoblast cultures (Sitara, Kim et al. 2008; Wang, Yoshiko et al. 2008). However, these studies have shown suppression of differentiation and matrix mineralization by the primary osteoblasts. We have not observed these effects on early differentiation, probably due to the little expression of FGF23 during the first 7 days of culture. During this period, expression of *Col1a1*, *RUNX2* and *osterix* decreases gradually in both control and infected cells, indicating that differentiation of the cultured MC3T3 cells progressed normally. We have however observed increased expression of *PHEX* and alkaline phosphatase in cells expressing FGF23/FLAG. This expression coincides with increase in expression of FGF23/FLAG. Both genes are considered late differentiation markers and are associated with the mineralization process (Ecarot and Desbarats 1999; Kotobuki, Matsushima et al. 2008). Their overexpression is thus consistent with the early appearance of mineralized nodules in the cultures

of MC3T3 cells expressing FGF23/FLAG. Although FGF23 has been shown to suppress the differentiation pattern of primary osteoblasts (Sitara, Kim et al. 2008; Wang, Yoshiko et al. 2008) our data suggest that it can influence the expression of differentiation-associated genes in MC3T3 cells when FGF23 expression starts after initiation of differentiation.

This earlier onset of mineralization is intriguing. Overexpression of FGF23 could lead to a faster differentiation and mineralization process without affecting general mineralization or even reduced mineralization as observed in the literature (Wang, Yoshiko et al. 2008; Yuan, Takaiwa et al. 2008). We also observed an increase in the number of mineralized foci in FGF23 overexpressing cells but the size of the foci was reduced in size compared to WT MC3T3 mineralizing cells (data not shown). This further supports the increased osteoblast differentiation rate. This faster differentiation rate possibly lead to differentiation from osteoblasts to osteocytes, which are terminally differentiated osteoblasts. Recent evidence showed that osteocytes are the cell type that expresses the highest levels of FGF23 (Liu, Zhou et al. 2006). It would then be possible that osteocytes could inhibit mineralization due to increased levels of FGF23 since FGF23 has been shown to inhibit mineralization.

Finally, our data indicate that a higher proportion of cells have acquired a senescence phenotype in cells overexpressing FGF23/FLAG. This senescence phenotype could be linked to increased osteocyte differentiation. This data is in agreement with the hypothesis that the increased rate of mineralization could lead to an increased number of osteocytes. Moreover, recent evidence showed that osteocytes can participate in the mineralization process via FGF23 expression (Feng, Ward et al. 2006). Combined with the observation that these cells express less apoptosis marker Fas than control cells, our data may indicate that FGF23 promotes cells to enter the senescence pathway rather than the apoptosis pathway.

TABLES

Table VII : Primers involved in this study

GENES	Forward 5'-3'	Reverse 5'-3'
Colla1	CATG TTCAGCTTTGTGGACCT	GCAGCTGACTTCAGGGATGT
osterix	AGCACCAATGGACTCCTCTC	GGGTGGGTAGTCATTTGCAT
phex	TCTGAAGCCAGAATGCATAGAA	CTCACAAGGATCCACAGAAAGA
fgf23	TATGGATCTCCACGGCAAC	GTCCACTGGCGGAACCTG
mmp3	TTGTTCTTTGATGCAGTCAGC	GATTTCGCGCCAAAAGTGC
fas	TGCAGACATGCTGTGGATCT	CTTAACTGTGAGCCAGCAAGC
fgfr2c	CCTGCGGAGACAGGTAACA	CGGGGTGTTGGAGTTCAT
fgfr3c	CTCAGGAGATGACGAAGATGG	GGGCGAGTCCAATAAGGAG
Runx2	CCACAAGGACAGAGTCAGATTACA	TGGCTCAGATAGGAGGGGTA

REFERENCES

- (2000). "Autosomal dominant hypophosphataemic rickets is associated with mutations in FGF23." Nat Genet **26**(3): 345-8.
- Bai, X. Y., D. Miao, et al. (2003). "The autosomal dominant hypophosphatemic rickets R176Q mutation in fibroblast growth factor 23 resists proteolytic cleavage and enhances in vivo biological potency." J Biol Chem **278**(11): 9843-9.
- Baum, M., S. Schiavi, et al. (2005). "Effect of fibroblast growth factor-23 on phosphate transport in proximal tubules." Kidney Int **68**(3): 1148-53.
- Beck, L., A. C. Karaplis, et al. (1998). "Targeted inactivation of Npt2 in mice leads to severe renal phosphate wasting, hypercalciuria, and skeletal abnormalities." Proc Natl Acad Sci U S A **95**(9): 5372-7.
- Brunner, T., R. J. Mogil, et al. (1995). "Cell-autonomous Fas (CD95)/Fas-ligand interaction mediates activation-induced apoptosis in T-cell hybridomas." Nature **373**(6513): 441-4.
- Ecarot, B. and M. Desbarats (1999). "1,25-(OH)₂D₃ down-regulates expression of Phex, a marker of the mature osteoblast." Endocrinology **140**(3): 1192-9.
- Feng, J. Q., L. M. Ward, et al. (2006). "Loss of DMP1 causes rickets and osteomalacia and identifies a role for osteocytes in mineral metabolism." Nat Genet **38**(11): 1310-5.
- Gregory, C. A., W. G. Gunn, et al. (2004). "An Alizarin red-based assay of mineralization by adherent cells in culture: comparison with cetylpyridinium chloride extraction." Anal Biochem **329**(1): 77-84.

- Iwata, T., L. Chen, et al. (2000). "A neonatal lethal mutation in FGFR3 uncouples proliferation and differentiation of growth plate chondrocytes in embryos." Hum Mol Genet **9**(11): 1603-13.
- Ju, S. T., D. J. Panka, et al. (1995). "Fas(CD95)/FasL interactions required for programmed cell death after T-cell activation." Nature **373**(6513): 444-8.
- Kotobuki, N., A. Matsushima, et al. (2008). "Small interfering RNA of alkaline phosphatase inhibits matrix mineralization." Cell Tissue Res **332**(2): 279-88.
- Kuro-o, M., Y. Matsumura, et al. (1997). "Mutation of the mouse klotho gene leads to a syndrome resembling ageing." Nature **390**(6655): 45-51.
- Kurosu, H., Y. Ogawa, et al. (2006). "Regulation of fibroblast growth factor-23 signaling by klotho." J Biol Chem **281**(10): 6120-3.
- Kurosu, H., M. Yamamoto, et al. (2005). "Suppression of aging in mice by the hormone Klotho." Science **309**(5742): 1829-33.
- Larsson, T., S. I. Davis, et al. (2005). "Fibroblast growth factor-23 mutants causing familial tumoral calcinosis are differentially processed." Endocrinology **146**(9): 3883-91.
- Larsson, T., R. Marsell, et al. (2004). "Transgenic mice expressing fibroblast growth factor 23 under the control of the alpha1(I) collagen promoter exhibit growth retardation, osteomalacia, and disturbed phosphate homeostasis." Endocrinology **145**(7): 3087-94.
- Liu, S., R. Guo, et al. (2003). "Regulation of fibroblastic growth factor 23 expression but not degradation by PHEX." J Biol Chem **278**(39): 37419-26.
- Liu, S., J. Zhou, et al. (2006). "Pathogenic role of Fgf23 in Hyp mice." Am J Physiol Endocrinol Metab **291**(1): E38-49.
- Mirams, M., B. G. Robinson, et al. (2004). "Bone as a source of FGF23: regulation by phosphate?" Bone **35**(5): 1192-9.

- Saito, H., K. Kusano, et al. (2003). "Human fibroblast growth factor-23 mutants suppress Na⁺-dependent phosphate co-transport activity and 1 α ,25-dihydroxyvitamin D3 production." J Biol Chem **278**(4): 2206-11.
- Segawa, H., E. Kawakami, et al. (2003). "Effect of hydrolysis-resistant FGF23-R179Q on dietary phosphate regulation of the renal type-II Na/Pi transporter." Pflugers Arch **446**(5): 585-92.
- Serrano, M., A. W. Lin, et al. (1997). "Oncogenic ras provokes premature cell senescence associated with accumulation of p53 and p16INK4a." Cell **88**(5): 593-602.
- Shimada, T., M. Kakitani, et al. (2004). "Targeted ablation of Fgf23 demonstrates an essential physiological role of FGF23 in phosphate and vitamin D metabolism." J Clin Invest **113**(4): 561-8.
- Shimada, T., S. Mizutani, et al. (2001). "Cloning and characterization of FGF23 as a causative factor of tumor-induced osteomalacia." Proc Natl Acad Sci U S A **98**(11): 6500-5.
- Sitara, D., S. Kim, et al. (2008). "Genetic evidence of serum phosphate-independent functions of FGF-23 on bone." PLoS Genet **4**(8): e1000154.
- Wang, D., K. Christensen, et al. (1999). "Isolation and characterization of MC3T3-E1 preosteoblast subclones with distinct in vitro and in vivo differentiation/mineralization potential." J Bone Miner Res **14**(6): 893-903.
- Wang, H., Y. Yoshiko, et al. (2008). "Overexpression of fibroblast growth factor 23 suppresses osteoblast differentiation and matrix mineralization in vitro." J Bone Miner Res **23**(6): 939-48.
- Ward, L. M., F. Rauch, et al. (2004). "Resolution of severe, adolescent-onset hypophosphatemic rickets following resection of an FGF-23-producing tumour of the distal ulna." Bone **34**(5): 905-11.
- White, K. E., G. Carn, et al. (2001). "Autosomal-dominant hypophosphatemic rickets (ADHR) mutations stabilize FGF-23." Kidney Int **60**(6): 2079-86.

- Yamashita, T., M. Konishi, et al. (2002). "Fibroblast growth factor (FGF)-23 inhibits renal phosphate reabsorption by activation of the mitogen-activated protein kinase pathway." J Biol Chem **277**(31): 28265-70.
- Yoshiko, Y., H. Wang, et al. (2007). "Mineralized tissue cells are a principal source of FGF23." Bone **40**(6): 1565-73.
- Yu, K., J. Xu, et al. (2003). "Conditional inactivation of FGF receptor 2 reveals an essential role for FGF signaling in the regulation of osteoblast function and bone growth." Development **130**(13): 3063-74.
- Yu, X., O. A. Ibrahimi, et al. (2005). "Analysis of the biochemical mechanisms for the endocrine actions of fibroblast growth factor-23." Endocrinology **146**(11): 4647-56.
- Yuan, B., M. Takaiwa, et al. (2008). "Aberrant Phex function in osteoblasts and osteocytes alone underlies murine X-linked hypophosphatemia." J Clin Invest **118**(2): 722-34.

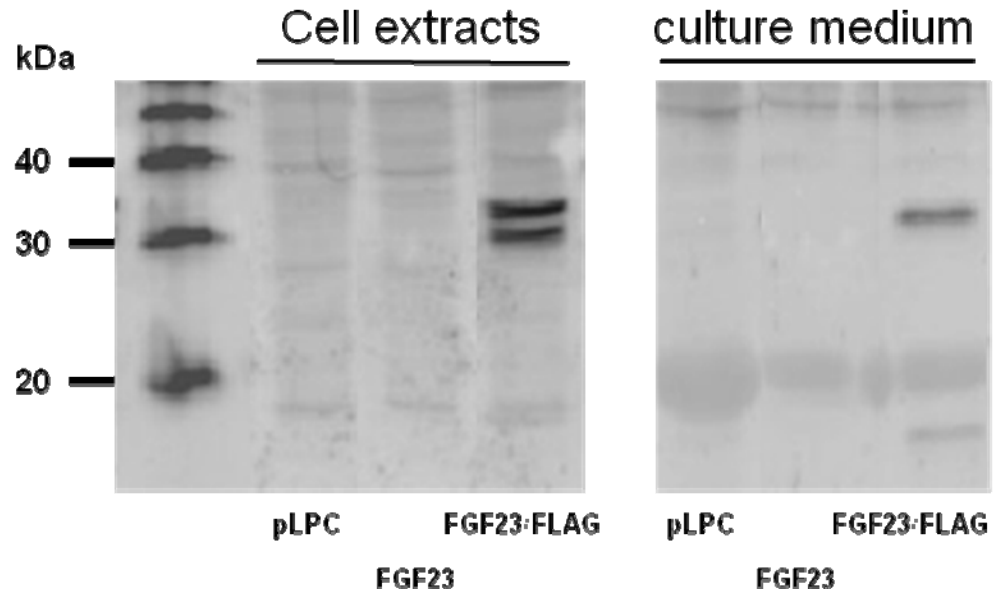


Figure 1 : FGF23 is correctly expressed by MC3T3 cells.

Figure 1: FGF23 is correctly expressed by MC3T3 cells. MC3T3 cells overexpressing pLPC vector alone, FGF23 or FGF23/FLAG were lysed and the proteins extracted as described in material and methods. 50 μ g of protein from the cell extracts and the corresponding supernatant were resolved on a 12% polyacrylamide gel. FGF23 protein was revealed using the anti-FLAG M2 monoclonal antibody.

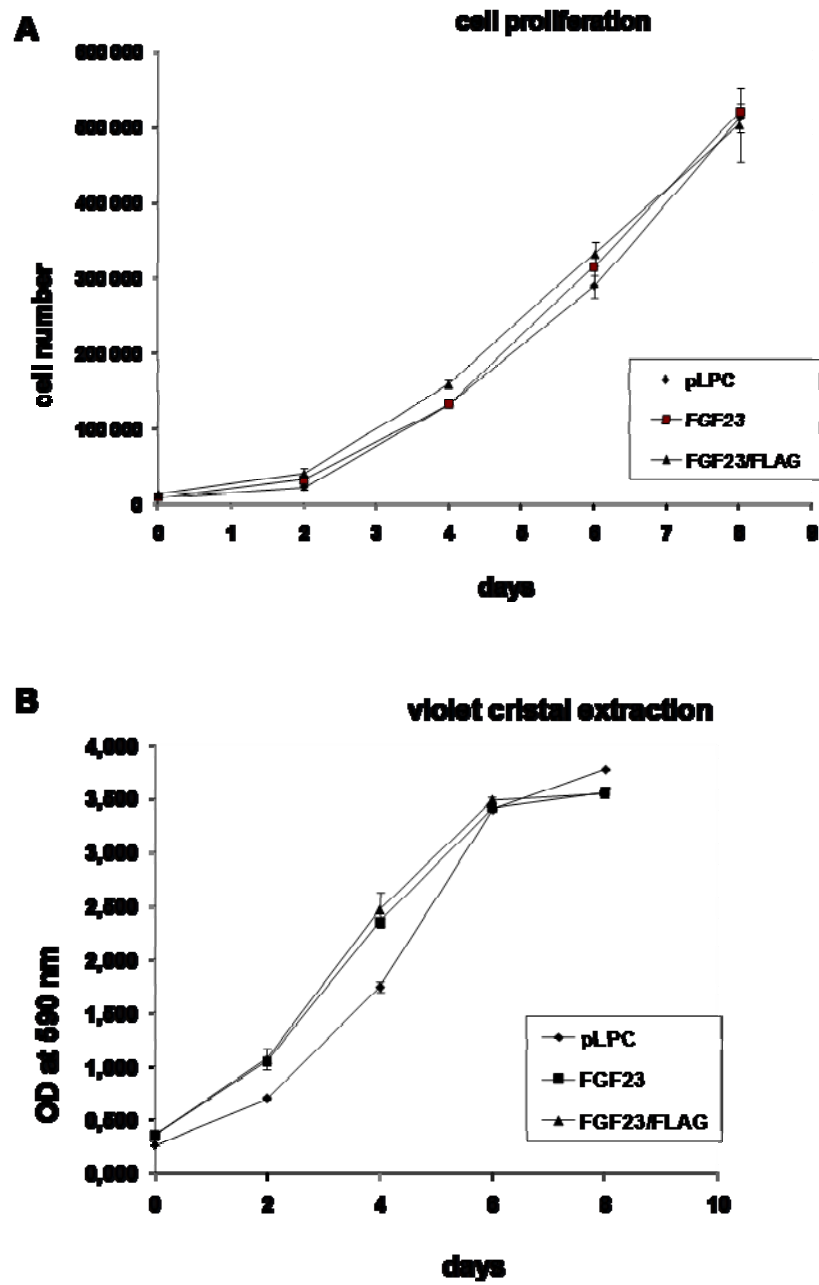


Figure 2 : Overexpression of FGF23 does not affect proliferation.

Figure 2: Overexpression of FGF23 does not affect proliferation. A) For growth curves, cells were seeded 2×10^4 cells in each well of a 12-well plate. Cells were counted immediately after attachment (day 0) and on days 2, 4, 6 and 8 after plating. There is no change between Wild-type, pLPC, FGF23 or FGF23/FLAG cells. B) Violet-crystal growth curves of wild-type MC3T3 cells and MC3T3 cells containing empty vector (pLPC), FGF23 and FGF23/FLAG were seeded at 2×10^4 cells in each well of a 12-well plate. OD at 590 nm is reflective of the cells number at days 0, 2, 4, 6 and 8. No change is observed between the different overexpressing cells.

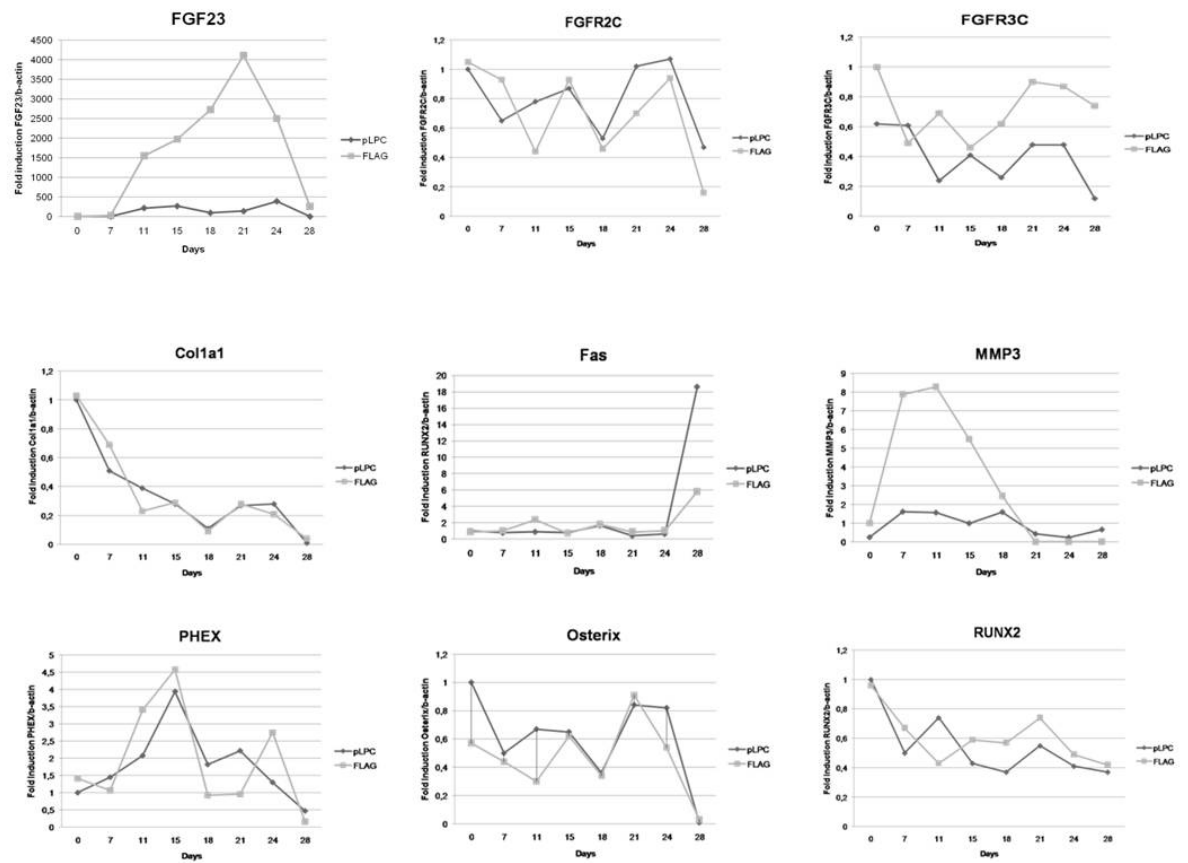


Figure 3 : Expression of marker genes in MC3T3 cells overexpressing FGF23.

Figure 3: Expression of marker genes in MC3T3 cells overexpressing FGF23. Genes associated to differentiation, mineralization and apoptosis were assayed in MC3T3 cells overexpressing vector alone (pLPC), or FGF23/FLAG (FLAG) during mineralization.

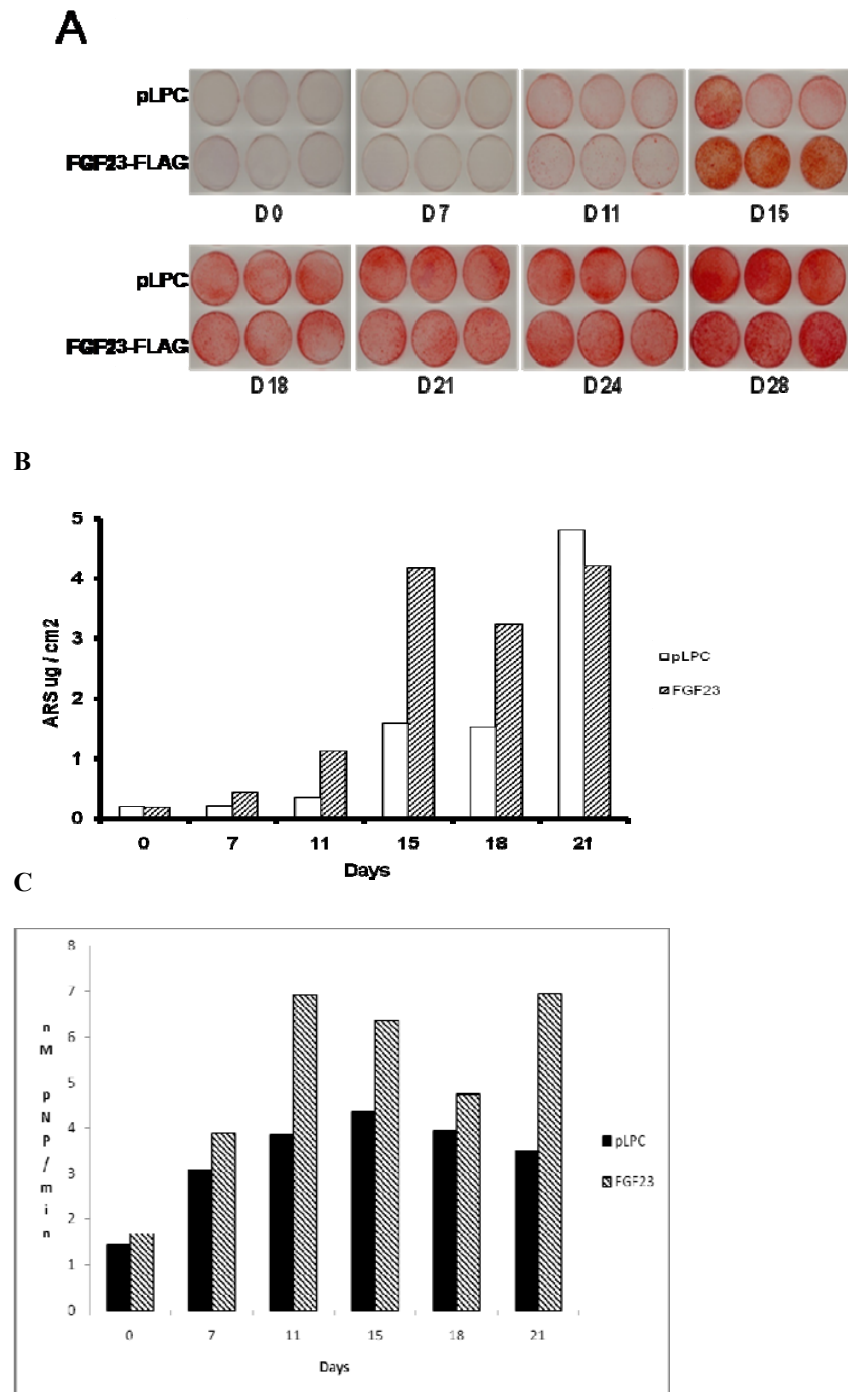


Figure 4 : MC3T3 cells overexpressing FGF23 display early mineralization that is restored at later days.

Figure 4: MC3T3 cells overexpressing FGF23 display early mineralization that is restored at later days. Mineralization was evaluated by alizarin red staining and alkaline phosphatase activity. A and B) Alizarin red staining was performed as described in material and methods. Staining is expressed as μg of ARS by cm^2 . Alizarin red staining shows an increase in staining at days 11-15 and 18 for cells overexpressing FGF23/FLAG compared to wild-type and pLPC overexpressing MC3T3 cells. At days 21 and 24, this increase is not observed anymore, indicating that the mineralization occurs more rapidly in FGF23/FLAG overexpressing MC3T3 cells. C) Alkaline phosphatase activity was performed as described in material and methods. Units are presented as nM of pNp.

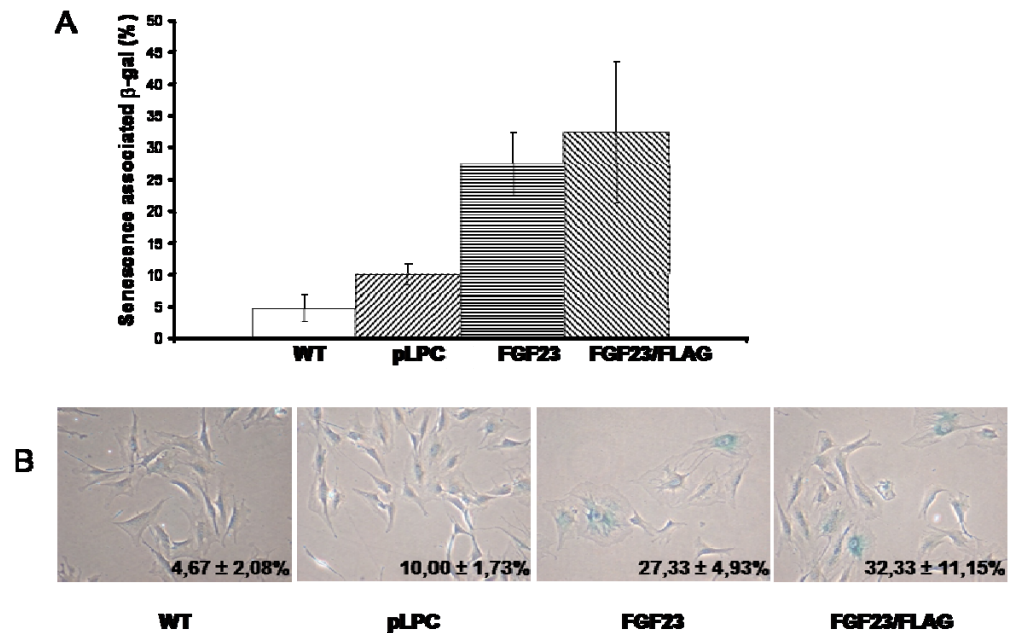


Figure 5 : FGF23 overexpression induce senescence in MC3T3 cells.

Figure 5: FGF23 overexpression induce senescence in MC3T3 cells. A, B) SA- β -gal staining: cells were fixed and stained at a day corresponding to day 6 of the growth curve. The graph in A) shows the average of cells that stained positive for SA- β -gal after counting 200 cells in three separated experiments. Cells overexpressing FGF23 and FGF23/FLAG showed 27 and 30% senescence compared to 5 and 10% for wild-type and vector alone MC3T3 cells.

Chapitre 5 – discussion et conclusions

Ce chapitre conclura la thèse. Il sera divisé en deux sections, l'une comportera la discussion et l'autre servira de conclusion à cette thèse. La discussion fera la synthèse des résultats présentés aux chapitres 2, 3 et 4 et traitera du rôle de PHEX dans des maladies reliées au métabolisme du phosphate et des autres protéines impliquées dans ce type de maladies comme FGF23 par exemple. La conclusion portera sur des avenues envisagées afin de répondre aux questions importantes soulevées dans cette thèse.

I) Discussion

PHEX joue un rôle important dans le processus de la minéralisation osseuse. Cette affirmation est supportée par une grande quantité de résultats présentés dans l'introduction de cette thèse, mais en particulier par la découverte que PHEX, un membre de la famille de l'endopeptidase neutre, est muté chez les patients souffrant de XLH (1995) de même que chez la souris *Hyp* qui est depuis longtemps considérée comme un modèle de la maladie humaine. Une perte de fonction de PHEX est donc responsable des symptômes de la maladie. Dans ce contexte, il est important de bien comprendre la régulation de ce gène pour acquérir une meilleure connaissance du rôle de PHEX dans le mécanisme normal de la minéralisation osseuse.

1) La régulation de PHEX.

1.1) La régulation de PHEX par la voie de la protéine kinase A.

Nous avons donc voulu déterminer si des protéines/peptides importants dans le processus de minéralisation pouvaient être importants pour la régulation de PHEX. Nos résultats ont montré que le PTH₍₁₋₃₄₎ et le PTHrP₍₁₋₃₄₎ pouvaient diminuer l'expression de PHEX tant au niveau de son ARNm que de la protéine dans la lignée cellulaire UMR-106. Cette régulation passe par la voie de la protéine kinase A, où une accumulation d'AMPc est remarquée lorsque ces cellules sont traitées avec du PTHrP₍₁₋₃₄₎. Cet effet est spécifique à PHEX puisqu'une autre enzyme de la même famille que PHEX, NEP, également présente à la surface des ostéoblastes, n'est pas régulée par le PTHrP₍₁₋₃₄₎. Le PTHrP₍₁₋₃₄₎ lie le récepteur PTH/PTHrP de type I, présent à la surface des ostéoblastes, dont les ostéoblastes de la lignée cellulaire UMR-106. Nous avons observé que c'est par la liaison à ce récepteur que le PTHrP₍₁₋₃₄₎ régule l'expression de PHEX dans notre étude. En effet, le PTHrP₍₁₀₇₋₁₁₁₎, qui ne lie pas ce récepteur, ne parvient pas à réguler à la baisse l'expression de PHEX.

Un fait intéressant montre également que PHEX est régulée de la même façon par le PTHrP₍₁₋₃₄₎ dans des cultures primaires d'ostéoblastes au jour 7. Aucune régulation de PHEX ne survient à des jours plus tardifs dans le cadre de notre étude. Ceci est consistant avec les patrons d'expression de PTHrP et son récepteur tel que rapporté dans la littérature. Une corrélation étroite a déjà été montrée dans le passé entre le début du processus de minéralisation et l'expression de *Phex* (Ruchon, Marcinkiewicz et al. 1998; Ruchon, Tenenhouse et al. 2000). De plus, pour ce qui est de l'expression du récepteur PTH/PTHrP de type I, il est rapporté dans la littérature que ce récepteur est plus exprimé au

niveau des pré-ostéoblastes et que son expression diminue lors de la différenciation finale des ostéoblastes (McCauley, Koh et al. 1996). De plus, l'expression du PTHrP est plus élevée dans des cellules non différenciées que dans des ostéoblastes matures (Suda, Gillespie et al. 1996; Oyajobi, Lomri et al. 1999). Il est possible que le PTHrP, en agissant de façon paracrine sur les pré-ostéoblastes, empêche l'expression de PHEX au début de la différenciation. Il n'est pas établi cependant si par exemple, l'expression de PHEX est augmentée pendant le processus de différenciation chez des souris ayant subi l'ablation du gène du *PTHrP* ou du récepteur *Pth/Pthrp* de type I. C'est un paramètre qui serait intéressant de vérifier.

La cible de la PKA responsable de la répression de PHEX lors du traitement au PTHrP n'est pas encore identifiée avec certitude. Cependant, il a été montré que le PTHrP peut augmenter l'expression de E4BP4, un facteur de transcription de la famille des « leucine zippers » (Ozkurt and Tetradis 2003; Ozkurt, Pirih et al. 2004). Dans les ostéoblastes, E4BP4 agit comme répresseur. Deux éléments de liaison d'E4BP4 sont présents dans le promoteur de PHEX et des études faites dans notre laboratoire montrent qu'E4BP4 peut se lier à ces éléments. De plus, la surexpression d'E4BP4 dans les cellules UMR-106 entraîne une diminution de PHEX. CREB, qui possède aussi des sites de liaison au niveau du promoteur de PHEX, est une autre protéine activée par le PKA lors d'un traitement au PTHrP. Il a de plus été montré qu'E4BP4 et CREB peuvent former des hétérodimères (Mundlos, Otto et al. 1997). Il est donc possible que ces deux facteurs agissent en coopération. L'hétérodimérisation de CREB et E4BP4 aurait alors pour rôle de réguler de façon négative l'expression de PHEX suite à un traitement au PTHrP. Cette hypothèse reste cependant à être vérifiée. Des études de co-immunoprécipitations suite à un traitement au PTHrP sur des cellules UMR-106 comparativement à des cellules non traitées

pourraient montrer une plus grande quantité de E4BP4 et de CREB interagissant l'un avec l'autre, si cette hypothèse est vraie.

Une autre hypothèse implique le facteur RUNX-2, qui a aussi des sites de liaison au niveau du promoteur de PHEX. RUNX-2 est un autre facteur important pour la différenciation osseuse. Il a été démontré d'une part que le PTHrP(1-34) pouvait diminuer l'expression de RUNX-2 et d'autre part que Runx-2 est responsable de l'augmentation de l'expression de PHEX par les glucocorticoïdes (Hines, Collins et al. 2002). Dans le processus de minéralisation, l'expression de RUNX-2 aurait pour rôle de stimuler l'expression de PHEX lors de la différenciation et de l'initiation de la minéralisation. À mesure que les cellules se différencient et que la minéralisation débute, l'augmentation graduelle de RUNX-2 pourrait permettre l'expression de PHEX, reconnu comme un marqueur ostéoblastique de la minéralisation. Cette hypothèse reste cependant à être confirmée.

Les deux hypothèses suggérées ne sont pas mutuellement exclusives. En effet, RUNX-2 serait responsable de l'augmentation de l'expression de PHEX à des moments plus précoces lors du début de la minéralisation tandis que l'effet observé par le PTHrP nécessitant E4BP4 pourrait subvenir à des moments plus tardifs, vers la fin du processus de minéralisation. Il a été montré que l'expression de PHEX diminue avec l'âge. Cette diminution de l'expression serait alors due en partie à l'effet d'E4BP4 sur PHEX. Ces deux mécanismes feraient alors partie d'un système permettant le contrôle fin de l'expression de PHEX dans le temps.

1.2) La régulation de PHEX par la voie de la protéine kinase C.

PHEX est également régulée par des agents activant la voie de la protéine kinase C. Des cellules traitées avec du TPA, un agent activant la voie de la protéine kinase C, montrent une augmentation de l'expression de PHEX, tant au niveau de la protéine que de l'ARNm.

Le PTHrP₍₁₋₃₄₎, lorsqu'utilisé à des concentrations de l'ordre de 10^{-12} - 10^{-11} M et 10^{-9} - 10^{-8} M active également la voie de la protéine kinase C. Cependant, c'est une diminution nette de l'expression de l'ARNm de *Phex* qui est observée. Il est intéressant de noter que le TPA et le PTHrP peuvent activer différents isozymes de la PKC. Par exemple, nous avons démontré que le PTHrP₍₁₋₃₄₎ permet un déplacement de la PKC δ vers le noyau, où le TPA montre quant à lui une diminution marquée de l'expression de cet isozyme. Ensuite, le TPA permet le recrutement de l'isozyme α de la PKC vers la membrane et le noyau tandis que le PTHrP₍₁₋₃₄₎ ne cause aucun changement dans la redistribution de cet isozyme de la PKC. Ceci nous indique donc que le PTHrP₍₁₋₃₄₎ ne peut réguler à la hausse l'expression de l'ARNm de PHEX. Pour le moment, il n'y a pas de molécules physiologiques qui ont montré une hausse de l'expression de PHEX passant par la voie de la protéine kinase C.

L'effet du TPA n'a pas été observé en ce qui a trait à l'augmentation de l'expression de l'ARNm de *Phex* sur les cultures primaires d'ostéoblastes de rat. Selon les données précédentes, il est possible d'affirmer que c'est peut-être dû au fait que l'isozyme α de la PKC, responsable de la régulation de l'expression de l'ARNm de *Phex* dans la lignée UMR-106, n'est pas exprimée lors de la différenciation des ostéoblastes dans des cultures primaires de calvarias de rat. Des peptides/protéines passant par d'autres isozymes de la PKC pourraient être des candidats de choix dans des études sur la régulation de l'expression de PHEX.

2) La localisation cellulaire de PHEX.

Une mutation répertoriée chez un patient XLH est intrigante en soi. Présente à la position 4 dans la queue cytosolique intracellulaire de PHEX, celle-ci est un changement d'un acide glutamique pour une glutamine (E4Q). Il est théoriquement exclu que cette mutation interfère avec le site catalytique de l'enzyme, présent dans la large partie cytosolique de l'enzyme. Nous avons vérifié ce fait par un test enzymatique utilisant un substrat synthétique de PHEX. Ce substrat est clivé de la même façon par la protéine mutante que par la protéine sauvage. De plus, l'expression membranaire de ce mutant, tel que vérifié par des essais de biotinylation de surface, nous montre que ce mutant est présent dans la fraction biotinylée de l'essai, mais aussi présente dans la fraction non biotinylée. Les fractions biotinylées et non biotinylées représentent la fraction membranaire et intracellulaire, respectivement.

2.1) Localisation sous-cellulaire de PHEX et le processus de minéralisation

La minéralisation se fait grâce à des vésicules de calcification, originant de la membrane plasmique. Ces vésicules sont formées dans des domaines spécifiques de la membrane plasmique puisque certaines protéines se retrouvent enrichies dans ces vésicules de calcification (Boskey, Boyan et al. 1997). Nous avons découvert que PHEX se trouvait enrichi dans ces vésicules, lors de la minéralisation par des cellules de la lignée MC3T3.

La mutation E4Q dans la queue cytosolique se trouve dans un motif di-acide. Il a été rapporté que ce motif pouvait lier les vésicules de type COPII. Des mutations dans ce motif di-acide causent, chez d'autres protéines dont VSV-G, un retard de la sortie du réticulum endoplasmique (Nishimura and

Balch 1997; Nishimura, Bannykh et al. 1999; Sevier, Weisz et al. 2000). Nous avons montré que la queue cytosolique de PHEX portant la mutation E4Q ne peut lier COPII comparativement à la protéine sauvage et que la queue cytosolique de PHEX contenant le motif di-acide intégral pouvait diriger des protéines chimériques PHEX/NEP mais pas la queue cytosolique contenant le motif muté.

Ce phénomène est très intéressant en soi. La présence de PHEX dans des endroits précis de la membrane plasmique pourrait avoir un effet sur sa fonction lors de la minéralisation. Ceci est consistant avec la présence spécifique d'autres protéines importantes pour la minéralisation dans les vésicules de calcification. ENPP1, par exemple, une des protéines présentes de façon spécifique dans les vésicules de calcification possède également un motif di-acide dans sa queue cytosolique. ENPP1 possède en plus un motif di-leucine important pour sa localisation à la membrane basolatérale (Vaingankar, Fitzpatrick et al. 2004). PHEX ne possède pas un tel motif. Il est à souligner que contrairement à PHEX, ENPP1 est exprimée dans plusieurs types cellulaires et que la queue cytosolique plus grande de ENPP1 (76 résidus comparativement à 17 pour PHEX) permet la présence d'autres motifs de localisation pour assurer une localisation adaptée aux cellules qui l'expriment. L'interaction avec le complexe COPII par le motif di-acide de PHEX pourrait donc être un mécanisme plus général pour incorporer des protéines importantes pour la minéralisation dans les vésicules de calcification. Il serait très intéressant de voir si des mutations dans le motif di-acide de ENPP1 altèrent sa localisation dans les vésicules de calcification. De plus, il serait possible de surexprimer ce mutant de ENPP1 dans des souris ayant subi une ablation génique pour *Enpp1*. Il serait possible de voir si ces souris possèdent un phénotype similaire aux souris *Enpp1* ^{-/-}. Ce type d'expérience est plus ou moins réalisable chez les souris *Hyp* par exemple où il a déjà été montré que la

surexpression de PHEX avec le promoteur de l'ostéocalcine était incapable de rétablir le phénotype de souris sauvages. Nous ne pourrions pas surexprimer ces mutants de PHEX afin de voir un effet sur le phénotype. Ces expériences sur ENPP1 pourraient donc nous donner une réponse plus complète sur le rôle du motif di-acide lors de la minéralisation par les vésicules de calcification.

NEP, le membre phare de la famille de l'endopeptidase neutre à laquelle fait partie PHEX donne d'autres indications quant à la possible localisation dans des domaines spécialisés de la membrane plasmique. En effet, NEP interagit avec la protéine EZRIN, qui sert de pont entre les filaments d'actine et la membrane plasmique. Ceci forme un complexe comprenant la kinase Lyn et la sous-unité p85 de la phosphatidylinositol 3 kinase (PI3 kinase) (Iwase, Shen et al. 2004). Ces protéines font partie des podosomes des cellules épithéliales et sont responsables de la motilité cellulaire. L'interaction entre NEP et EZRIN se fait grâce à un motif d'acide aminé chargés contenant des lysines, ce genre de motif étant également présent dans la queue cytosolique de PHEX (Iwase, Shen et al. 2004). Il est donc possible que la présence de PHEX dans ces complexes spécifiques soit observée. Des expériences de co-immunoprécipitations pourraient être effectuées afin de voir si PHEX et EZRIN peuvent interagir l'un avec l'autre. De plus, des mutations de ce domaine permettraient de voir si cette interaction potentielle est maintenue ou perdue. Par la suite, il serait possible d'effectuer des tests de motilité impliquant des cultures primaires d'ostéoblastes sauvages comparativement à des cultures primaires d'ostéoblastes provenant de souris *Hyp*. De cette façon, il serait possible d'établir un lien entre la présence dans ces complexes spécifiques et de sa fonction au sein de ces complexes.

Nos études suggèrent donc que la présence de PHEX dans des vésicules de calcification peut avoir un effet sur la minéralisation. La localisation de PHEX dans ce type de vésicules lui permettrait d'exercer un effet au lieu de la minéralisation, lors du dépôt des cristaux d'hydroxyapatite sur la matrice

extracellulaire. Cette hypothèse est appuyée par un essai de compétition où la surexpression de la queue cytosolique sous sa forme intacte possédait un effet « dominant négatif » et faisait en sorte de diminuer la présence de PHEX dans les vésicules de calcification. L'explication est que c'est que la surexpression de la queue cytosolique qui sature l'interaction avec COPII et fait en sorte que PHEX se retrouve de façon moins importante dans les vésicules de calcification par rapport aux cellules MC3T3 ne surexprimant pas ce peptide. Il en résulte une moins grande minéralisation par ces cellules.

Il est intéressant de postuler que PHEX, tout comme la phosphatase alcaline et ENPP1, fait partie d'un groupe de protéines importantes pour la minéralisation qui est spécifiquement dans les vésicules de calcification. En ce sens, des études récentes ont démontré que l'expression de PHEX pouvait être modulée par l'activité de la phosphatase alcaline, probablement par un effet indirect (Orimo, Goseki-Sone et al. 2008; Orimo and Shimada 2008). L'addition de levimasole, un inhibiteur spécifique de la phosphatase alcaline à des cellules SaOS-2 en culture montre une diminution de l'expression de *PHEX*, laissant suggérer que le phosphate produit par la phosphatase alcaline régulerait PHEX à la baisse. De plus, cette étude a montré que *ENPP1* était régulée à la hausse par ce même traitement au levimasole. De plus, des études ont montré que PHEX était inhibée par le pyrophosphate inorganique ainsi que le phosphate (Boileau, Tenenhouse et al. 2001). Une régulation hautement précise du phosphate semble donc importante pour l'expression ainsi que l'activité de PHEX. Pour compléter ces études, il serait intéressant d'évaluer dans des conditions de minéralisation, l'activité de PHEX suite à l'inhibition de la phosphatase alcaline avec le levimasole ou avec l'inhibition de l'activité de ENPP1 par l'acide phosphonoformique (Orimo and Shimada 2008)

2.2 Rôle de PHEX dans les vésicules de calcification

PHEX fait partie de la famille M13 des endopeptidases et des études effectuées *in vitro* ont montré qu'elle possédait effectivement une activité endopeptidasique. Il est donc logique de penser que la fonction de PHEX au niveau des vésicules de calcification est de contrôler l'activité d'un peptide pouvant réguler la minéralisation, soit en l'activant ou encore en le dégradant. Le premier candidat qui vient à l'esprit est MEPE. MEPE est synthétisé et sécrété dans la matrice extracellulaire par les ostéoblastes et il a été suggéré que la libération du motif ASARM de MEPE, présumément par la cathepsine B, cause une inhibition de la minéralisation. Il a été montré par résonance plasmique de surface que PHEX pouvait lier MEPE sans pour autant contribuer à son clivage et il a donc été suggéré que cette interaction bloquait l'activité de la cathepsine B et donc la libération du motif ASARM (Rowe, Matsumoto et al. 2006). Cette affirmation reste cependant un sujet de débat. Une étude plus approfondie de la séquence du motif ASARM montre des sites de clivage potentiels par PHEX et une étude récente montre que PHEX peut cliver ASARM et détruire son effet inhibiteur sur la minéralisation (Campos, Couture et al. 2003; Addison, Nakano et al. 2008). Ces résultats suggèrent que PHEX localisée au niveau des vésicules de calcification empêche l'inhibition de la minéralisation par la dégradation de ASARM.

3) FGF23 dans la minéralisation.

FGF23 a été montré comme étant surexprimé dans plusieurs maladies humaines dont XLH, ADHR et OHO (2000; Shimada, Mizutani et al. 2001; Liu, Guo et al. 2003), et qui affecte de façon négative la biologie des ostéoblastes. Les expériences présentées ont étudié l'effet de la surexpression de

FGF23 sur la prolifération, la différenciation et la minéralisation de la matrice extracellulaire par les cellules MC3T3, un modèle admis de cellules de la lignée ostéoblastique (Wang, Christensen et al. 1999). Nous avons donc infecté ces cellules avec FGF23 et évalué des paramètres reliés à la minéralisation comme le marquage au rouge alizarin ou l'activité de la phosphatase alcaline. Nous avons montré que le processus de minéralisation apparaît de façon prématurée lorsque FGF23 est surexprimé. De plus, les nodules de minéralisation sont plus petits et plus nombreux. Si on regarde à des jours plus tardifs, on peut remarquer que la minéralisation est la même pour les cellules surexprimant le vecteur vide et les cellules surexprimant FGF23.

Une étude récente a montré que des souris inactivées pour les gènes du corécepteur NaPi de type II ainsi que pour FGF23 montrent des défauts dans l'expression de gènes importants dans la minéralisation, indépendamment de l'effet du phosphate circulant dans le sérum, puisque ce phosphate circulant est réduit dû à l'inactivation du corécepteur NaPi de type II (Sitara, Kim et al. 2008). Cette étude montre donc que FGF23 exerce des effets intrinsèques sur la minéralisation. Cette étude est en accord avec le lieu le plus important de l'expression de FGF23, soit les ostéocytes (Liu, Zhou et al. 2006). Cette étude vient compléter nos résultats qui montrent un problème dans le processus de minéralisation lorsque FGF23 est surexprimé. Cependant, ces études ont montré une suppression de la différenciation et conséquemment de la minéralisation de matrice dans des cultures primaires d'ostéoblastes. Nous n'avons pas observé ces effets sur la différenciation aux jours précoces, probablement due à la faible expression de FGF23 pendant les 7 premiers jours de culture. Au cours de cette période, l'expression du collagène 1a1, de *Runx-2* et d'*Ostérin* diminue graduellement dans les cellules sauvages et les cellules infectées, indiquant que la différenciation des cellules MC3T3 a progressé normalement. Nous avons cependant observé une plus grande expression de

PHEX et une activité phosphatase alcaline accrue dans les cellules exprimant FGF23/FLAG comparativement aux cellules sauvages. Cette expression coïncide avec l'augmentation de l'expression de FGF23/FLAG. Les deux gènes sont considérés les marqueurs tardifs de la différenciation et sont associés au processus de minéralisation (Ecarot and Desbarats 1999; Kotobuki, Matsushima et al. 2008). L'augmentation de leur expression coïncide alors avec l'apparition précoce des nodules de minéralisations dans les cultures des cellules MC3T3 surexprimant FGF23/FLAG. Bien que la surexpression de FGF23 ait montré une suppression de la différenciation des ostéoblastes dans des cultures primaires (Sitara, Kim et al. 2008; Wang, Yoshiko et al. 2008), nos données suggèrent que FGF23 puisse influencer l'expression des gènes associés à la différenciation des cellules MC3T3 quand l'expression de FGF23 augmente de façon radicale après le déclenchement de la différenciation des ostéoblastes.

Cette même étude supporte également que FGF23 puisse affecter la minéralisation (Sitara, Kim et al. 2008). Cette étude montre que la minéralisation des ostéoblastes est affectée de façon négative. Cependant, cette étude ne nous montre que le résultat obtenu sur une période de 21 jours. Si l'on compare avec notre étude où FGF23 est surexprimé dans des cellules MC3T3, on remarque que c'est au début de la minéralisation que FGF23 exerce un plus grand effet. Il est donc possible que le plan expérimental de leur étude n'ait pu détecter ces différences que nous avons observées avec la nôtre. Ces différences seront également discutées dans la prochaine section qui traite de la différenciation des ostéoblastes.

Si l'on prend en ligne de compte que KLOTHO n'est pas exprimé dans les ostéoblastes et que klotho aide à la liaison de FGF23 à son récepteur en augmentant son affinité pour celui-ci (Urakawa, Yamazaki et al. 2006), il serait intéressant de voir comment l'introduction de Klotho dans ce système

affecterait la minéralisation. Nous pourrions voir comment la surexpression de *klotho* dans des pré-ostéoblastes comme des cellules MC3T3 et soumis à un processus de différenciation/minéralisation affecte celui-ci. Ceci viendrait encore une fois supporter l'action de FGF23 sur les ostéoblastes.

De plus, il est bizarre que l'expression de FGF23 augmente lors de la surexpression de cette même protéine dans les cultures de cellules MC3T3 comparativement aux cultures sauvages. Il est possible que l'expression de FGF23 entraîne une boucle de rétroaction positive menant à une expression de plus en plus accrue de FGF23 lors du début du processus de minéralisation. L'expression temporelle de FGF23 serait alors importante pour sa fonction lors de la différenciation et du processus de minéralisation actif.

4) FGF23 dans le métabolisme du phosphate

Il est très bien documenté que la surexpression de FGF23 cause une diminution de la réabsorption du phosphate au niveau du rein. Cette diminution est due à une réduction de l'expression du cotransporteur NaPi2a des tubules proximaux rénaux (Shimada, Mizutani et al. 2001; Larsson, Marsell et al. 2004; Liu, Zhou et al. 2006). Le niveau d'expression de FGF23 pourrait alors avoir un effet sur la phosphatémie. Il est encore inconnu comment PHEX peut réguler l'expression de FGF23. Différentes hypothèses peuvent être avancées par rapport à ce rôle. Premièrement, PHEX, étant une peptidase, pourrait cliver un facteur cellulaire important pour cette fonction. Ce facteur devrait lier un récepteur et alors activer une cascade de signalisation cellulaire menant à l'augmentation de l'expression de FGF23. Ensuite, des souris surexprimant le PTH possèdent une expression de FGF23 supérieure à des souris sauvages (Kawata, Imanishi et al. 2007). Ceci nous indique qu'il est possible que cette

augmentation de l'expression de FGF23 par le PTH passe par PHEX. En effet, il a été mentionné précédemment que le PTH peut diminuer l'expression de PHEX (Vargas, St-Louis et al. 2003) et les souris *Hyp*, qui n'expriment pas PHEX, possèdent une expression accrue de FGF23. L'axe FGF23-PTH est renforcé par le fait que l'expression a été montrée comme pouvant inhiber l'expression de l'ARNm du *PTH* en une boucle de rétroaction (Ben-Dov, Galitzer et al. 2007; Krajisnik, Bjorklund et al. 2007).

Une étude récente a utilisé des souris ayant subi une ablation pour les gènes *Fgf23* et *Dmp1* (Liu, Zhou et al. 2008). Les souris *Dmp1* $-/-$ possèdent une diminution de la quantité de phosphate circulant dans le sérum, accompagné d'une augmentation de l'expression de FGF23 dans la circulation ainsi qu'au niveau des ostéocytes. Les souris ayant la double ablation génique possèdent les paramètres de phosphate circulant comparable aux souris *Fgf23* $-/-$, c'est-à-dire une augmentation des niveaux dans le sérum. Ceci indique que le rôle de DMP1 est relié à l'expression de FGF23. Ceci nous apporte une autre preuve quant au rôle central que possède FGF23 sur le métabolisme du phosphate. PHEX et DMP1 sont exprimés par les ostéoblastes et les ostéocytes. Bien que des études utilisant un promoteur surexprimant PHEX dans la lignée ostéoblastique des souris *Hyp* ne réussissent pas à normaliser la minéralisation, il semble plausible, à la lumière de ces faits que la régulation de l'expression de FGF23 se fasse au sein de la lignée ostéoblastique.

5) La différenciation des ostéoblastes

Nous avons voulu déterminer si c'est la prolifération des ostéoblastes qui permet une minéralisation plus précoce. Il a été montré que la prolifération

des cellules n'était pas affectée entre les cellules surexprimant FGF23 et les cellules sauvages, tel que montré par des essais de prolifération.

FGF23 a besoin d'un corécepteur, kLOTHO, pour lier avec une plus grande affinité son récepteur (Kurosu, Ogawa et al. 2006). De plus, des souris ayant été inactivées pour klotho montrent un phénotype de vieillissement. Ce phénotype correspond en fait à de la sénescence non-répllicative des cellules affectées. Nous avons donc voulu déterminer si les cellules de la lignée MC3T3 surexprimant FGF23 pouvaient être associées à un phénotype de sénescence. En effet, les cellules surexprimant FGF23 montrent un phénotype de sénescence tel que démontré par des essais où l'activité de la β -galactosidase à pH acide est augmentée par rapport aux cellules ne surexprimant pas FGF23. Il est donc possible de postuler selon les expériences effectuées précédemment que la différenciation de pré-ostéoblastes à ostéoblastes puis à ostéocytes se passe plus rapidement. L'apparition du phénotype de sénescence se ferait de façon plus importante au niveau des ostéocytes. Ce serait les ostéocytes qui entreraient préférentiellement en état de sénescence comparativement aux ostéoblastes par exemple. Ce déclenchement précoce de la minéralisation est intrigant. Il est possible que la surexpression de FGF23 puisse mener à une différenciation et à un processus de minéralisation plus rapide sans pour autant affecter la minéralisation générale ou même avec une minéralisation réduite tel qu'observé dans la littérature (Wang, Yoshiko et al. 2008; Yuan, Takaiwa et al. 2008). La liaison de KLOTHO au récepteur FGFR2c et FGFR3c potentialise l'action de FGF23. Dans notre système, KLOTHO est absent puisque non-exprimé par les ostéoblastes. Il serait intéressant de surexprimer de façon simultanée FGF23 et KLOTHO et de voir ainsi l'effet sur la minéralisation. Il est possible que les effets modestes sur la minéralisation observés dans notre système soit dû à l'absence de KLOTHO ce qui ferait en sorte que l'affinité de FGF23 à son récepteur serait réduite. De plus, il est possible que le clivage de

FGF23 soit altéré. L'expression de prohormones convertases importantes pour le clivage de FGF23 pourrait être anormalement régulée dans notre système. L'expression de FGF23 s'en verrait alors modifiée.

Nous avons également observé une augmentation du nombre de nodules de minéralisation dans les cultures de cellules surexprimant FGF23/FLAG. Cependant, la taille des nodules de minéralisation est réduite comparativement aux cellules MC3T3 sauvages en minéralisation (données non publiées). Cet élément supplémentaire soutient également le fait que le début de la minéralisation chez les cellules MC3T3 surexprimant FGF23 survient plus rapidement que dans les cellules sauvages. Cet accroissement de la différenciation mène probablement à la différenciation des ostéoblastes aux ostéocytes, qui sont les ostéoblastes totalement différenciés. Des évidences récentes ont montré que les ostéocytes sont le type cellulaire qui exprime les niveaux les plus élevés de FGF23 (Liu, Zhou et autres 2006). Il serait alors possible que ce soit les ostéocytes, par l'expression accrue de FGF23, qui pourraient alors empêcher la minéralisation. De plus, nos données indiquent qu'une proportion plus élevée de cellules a acquis un phénotype de sénescence dans les cellules surexprimant FGF23/FLAG. Ce phénotype de sénescence est peut-être lié à la différenciation accrue des ostéoblastes en ostéocytes. Ces données sont en accord avec l'hypothèse que le plus grand taux de minéralisation pourrait mener à un plus grand nombre d'ostéocytes. D'ailleurs, une étude récente a prouvé que les ostéocytes peuvent participer au processus de minéralisation par l'intermédiaire de l'expression FGF23 (Feng, Ward et al. 2006). Combiné avec l'observation que ces cellules expriment de façon moins importante le facteur d'apoptose *Fas* que les cellules sauvages, nos données tendent à indiquer que FGF23 pourrait favoriser les cellules à entrer dans la voie de sénescence plutôt qu'en apoptose.

Par la suite, si l'on prend en compte que PHEX est exprimée par les ostéocytes et que PHEX puisse également, par un mécanisme encore inconnu, réguler l'expression de FGF23, PHEX pourrait donc avoir un rôle au niveau des ostéocytes. Ces cellules possèdent une activité réduite. Cependant, ces cellules établissent des connexions de type « gap junctions » avec les autres cellules osseuses.

Un article récent montre que l'absence d'expression de PHEX dans la lignée ostéoblastique uniquement peut affecter la minéralisation (Yuan, Takaiwa et al. 2008). Il serait alors possible de postuler que c'est l'expression de PHEX à un moment opportun dans la différenciation des ostéoblastes qui pourrait être essentielle à sa fonction. C'est peut-être pour cette raison que des transgènes de PHEX réintroduits dans la souris *Hyp* ne peuvent corriger les défauts de minéralisation que de façon partielle (Bai, Miao et al. 2002; Liu, Guo et al. 2002; Erben, Mayer et al. 2005). Il faudrait donc utiliser des promoteurs spécifiques à la lignée ostéoblastique de protéines exprimées à des moments différents de la différenciation cellulaire jusqu'à la période de minéralisation. De cette façon, il sera peut-être possible de cibler le moment précis où peut intervenir PHEX dans la minéralisation. L'apparition de l'ARNm de *Phex* chez la souris survient au jour E5-E7 de façon concomitante avec des marqueurs de la minéralisation des ostéoblastes. Il est possible que l'expression de PHEX soit nécessaire lors de la différenciation ainsi qu'à des moments plus tardifs. Il serait intéressant d'utiliser des promoteurs de protéines importantes dans le processus de différenciation des ostéoblastes comme par exemple RUNX2 qui est exprimé tout au long de la différenciation ou OSTÉRIX si l'on veut une protéine exprimée plus tard dans ce même processus.

De plus, il est possible que PHEX réponde à différents stimuli et que certains pics d'expression à des moments opportuns doivent être nécessaires

pour sa fonction. Si l'on prend en compte que l'expression de PHEX est modifiée selon plusieurs molécules comme la vitamine D, les glucocorticoïdes ou le PTH par exemple abonde dans ce sens. Bref, plusieurs voies de signalisations pourraient augmenter ou diminuer l'expression de PHEX à des moments précis au cours de la différenciation des ostéoblastes ou même de la minéralisation. De plus, il a été montré que l'expression de PHEX diminuait avec le temps, ce qui n'est pas nécessairement le cas avec l'actine ou le collagène par exemple, deux promoteurs utilisés dans différentes études. L'utilisation de promoteurs provenant d'autres protéines ne pourrait pas nous donner réponse à cette hypothèse. Avec la diminution de l'expression de PHEX avec l'âge, nous pouvons ajouter le fait que le déclenchement de la maladie XLH peut survenir à des périodes variables, pouvant même atteindre l'âge adulte. Un défaut de minéralisation dû à un problème de l'expression de PHEX au niveau des ostéocytes pourrait expliquer le déclenchement de la maladie à des moments plus tardifs. Ce serait le mauvais fonctionnement des ostéocytes, qui sont des cellules « inactives » lorsque la minéralisation est « terminée » qui ferait en sorte que ces personnes atteintes commenceraient à perdre du phosphate lors de l'excrétion rénale. Il est possible que ce soit les niveaux de FGF23 qui augmentent au niveau des ostéocytes avec l'âge et qui ferait alors en sorte que le déclenchement de maladie survienne. L'étude impliquant l'ablation génique simultanée de *Fgf23* et du co-récepteur NaPi de type II nous informe que c'est peut-être la différenciation des chondrocytes ou des ostéoblastes qui est affectée et qui ferait en sorte de l'apparition de défauts de minéralisation (Sitara, Kim et al. 2008). Considérant le fait que PHEX se retrouve en amont dans la cascade de signalisation possible de cet axe affectant la minéralisation, ceci nous pousse sur la possibilité que ce soit PHEX qui puisse avoir un rôle temporel dans l'initiation de la minéralisation. Cette initiation de la minéralisation aurait alors un effet sur la minéralisation totale par les

ostéoblastes, d'où l'apparition d'un phénotype observable chez les souris *Hyp* ou bien chez des souris possédant des mutations dans le site de clivage de FGF23.

II) Conclusion

Plusieurs études devront être entreprises afin de cerner le rôle physiologique de PHEX dans une maladie comme XLH. En fait, une percée majeure serait obtenue par l'établissement d'un substrat physiologique. Ce point demeure l'enjeu majeur dans la suite des études, car ceci pourrait nous aider à mieux comprendre son rôle dans la minéralisation. Des études de criblage sur une banque de substrats potentiels seraient intéressantes. La suite de cette étude impliquerait l'utilisation d'inhibiteurs spécifiques de PHEX.

De plus en plus d'études montrent que PHEX semble être importante dans la minéralisation sans pour autant impliquer son activité enzymatique (Rowe, Kumagai et al. 2004; Rowe, Garrett et al. 2005). Le fait que PHEX soit exprimée dans les ostéocytes et le fait que cette expression dans les ostéocytes puisse être importante pour la minéralisation va dans ce sens. La génération de souris mutantes pour le site catalytique de PHEX pourrait nous amener à mieux définir des rôles importants sur la fonction de PHEX n'étant pas nécessairement redondants avec des rôles impliquant son activité enzymatique.

Nos études impliquant FGF23 combinée avec les résultats d'autres études poussent également à supposer que PHEX pourrait être importante lors de la différenciation des ostéoblastes. Il faudra donc repenser au fait que PHEX constitue un marqueur des ostéoblastes matures. En effet, des études d'inactivations et de restauration de l'expression de PHEX à des moments

précis de la différenciation des ostéoblastes et de la minéralisation pourraient nous amener des informations cruciales quant à son rôle dans ces processus.

Finalement, nos études qui ont montré que l'expression de PHEX dans des endroits précis de la membrane plasmique pourrait être importante pour la minéralisation lui donne également un rôle quant au processus de minéralisation en tant que tel. Ces évidences pointent vers le fait que PHEX pourrait également faire partie des éléments essentiels à la structure des ostéoblastes. Dans ce cas précis, c'est l'expression dans ces domaines menant à la formation des vésicules de calcification qui serait importante pour sa fonction. L'étude de l'interaction avec d'autres membres présents dans ces vésicules de calcification pourrait être entreprise par des études de co-immunoprécipitation. L'analyse plus approfondie des résultats obtenus par spectroscopie de masse sur les protéines présentes dans les vésicules de calcification serait intéressante (Xiao, Camalier et al. 2007). En effet, certaines protéines importantes pour la minéralisation ont récemment été montrées comme présentes dans les vésicules de calcification comme par exemple l'ostéopontine et l'ostéocalcine (Nahar, Missana et al. 2008).

Le rôle central que joue FGF23 dans le métabolisme du phosphate nous pousse à penser que celui-ci pourrait jouer un rôle central pour la minéralisation. Il est de plus en plus évident que FGF23 influence directement le processus de minéralisation par les ostéoblastes. L'expression de FGF23 et de PHEX au niveau des ostéocytes vient changer le concept selon lequel ces mêmes ostéocytes ne participent que de façon passive à la minéralisation. Les données accumulées récemment et l'apport de nos données nous poussent maintenant à inclure les ostéocytes dans un processus actif de minéralisation. L'axe à développer consiste à savoir comment KLOTHO, le corecepteur de FGF23 puisse influencer la biologie des os, de la différenciation à la

minéralisation des ostéoblastes sans être exprimée dans ceux-ci, son action étant probablement endocrine. À la lumière des résultats obtenus, il semble de plus en plus probable que PHEX, et par conséquent FGF23, aient un rôle temporel lors de ces événements. Ces grandes lignes d'études nous permettront peut-être de faire le lien entre le vieillissement et la diminution de la minéralisation des os.

Bibliographie

- (1995). "A gene (PEX) with homologies to endopeptidases is mutated in patients with X-linked hypophosphatemic rickets. The HYP Consortium." Nat Genet **11**(2): 130-6.
- (2000). "Autosomal dominant hypophosphataemic rickets is associated with mutations in FGF23." Nat Genet **26**(3): 345-8.
- Aarden, E. M., E. H. Burger, et al. (1994). "Function of osteocytes in bone." J Cell Biochem **55**(3): 287-99.
- Abdul-Ghani, M., P. Y. Gougeon, et al. (2001). "PRA isoforms are targeted to distinct membrane compartments." J Biol Chem **276**(9): 6225-33.
- Addison, W. N., Y. Nakano, et al. (2008). "MEPE-ASARM peptides control extracellular matrix mineralization by binding to hydroxyapatite: an inhibition regulated by PHEX cleavage of ASARM." J Bone Miner Res **23**(10): 1638-49.
- Afzal, F., J. Pratap, et al. (2005). "Smad function and intranuclear targeting share a Runx2 motif required for osteogenic lineage induction and BMP2 responsive transcription." J Cell Physiol **204**(1): 63-72.
- Ai, M., S. Heeger, et al. (2005). "Clinical and molecular findings in osteoporosis-pseudoglioma syndrome." Am J Hum Genet **77**(5): 741-53.
- Akiyama, H., M. C. Chaboissier, et al. (2002). "The transcription factor Sox9 has essential roles in successive steps of the chondrocyte differentiation pathway and is required for expression of Sox5 and Sox6." Genes Dev **16**(21): 2813-28.
- Alos, N. and B. Ecarot (2005). "Downregulation of osteoblast Phex expression by PTH." Bone **37**(4): 589-98.
- Anderson, H. C. (1995). "Molecular biology of matrix vesicles." Clin Orthop Relat Res(314): 266-80.
- Anderson, H. C. (2003). "Matrix vesicles and calcification." Curr Rheumatol Rep **5**(3): 222-6.

- Anderson, H. C., J. B. Sipe, et al. (2004). "Impaired calcification around matrix vesicles of growth plate and bone in alkaline phosphatase-deficient mice." Am J Pathol **164**(3): 841-7.
- Argiro, L., M. Desbarats, et al. (2001). "Mepe, the gene encoding a tumor-secreted protein in oncogenic hypophosphatemic osteomalacia, is expressed in bone." Genomics **74**(3): 342-51.
- Aubin, J. E. (1992). "Osteoclast adhesion and resorption: the role of podosomes." J Bone Miner Res **7**(4): 365-8.
- Bacabac, R. G., D. Mizuno, et al. (2008). "Round versus flat: bone cell morphology, elasticity, and mechanosensing." J Biomech **41**(7): 1590-8.
- Bacconi, A., L. V. Virkki, et al. (2005). "Renouncing electroneutrality is not free of charge: switching on electrogenicity in a Na⁺-coupled phosphate cotransporter." Proc Natl Acad Sci U S A **102**(35): 12606-11.
- Bai, X., D. Miao, et al. (2004). "Transgenic mice overexpressing human fibroblast growth factor 23 (R176Q) delineate a putative role for parathyroid hormone in renal phosphate wasting disorders." Endocrinology **145**(11): 5269-79.
- Bai, X., D. Miao, et al. (2002). "Partial rescue of the Hyp phenotype by osteoblast-targeted PHEX (phosphate-regulating gene with homologies to endopeptidases on the X chromosome) expression." Mol Endocrinol **16**(12): 2913-25.
- Bai, X. Y., D. Miao, et al. (2003). "The autosomal dominant hypophosphatemic rickets R176Q mutation in fibroblast growth factor 23 resists proteolytic cleavage and enhances in vivo biological potency." J Biol Chem **278**(11): 9843-9.
- Balemans, W., E. PETERS, et al. (2008). "The binding between sclerostin and LRP5 is altered by DKK1 and by high-bone mass LRP5 mutations." Calcif Tissue Int **82**(6): 445-53.
- Barret, J. A., R. N. D., et al. (2000). Handbook of proteolytic enzymes. London, Academic Press.
- Baum, M., S. Schiavi, et al. (2005). "Effect of fibroblast growth factor-23 on phosphate transport in proximal tubules." Kidney Int **68**(3): 1148-53.

- Beck, L., A. C. Karaplis, et al. (1998). "Targeted inactivation of Npt2 in mice leads to severe renal phosphate wasting, hypercalciuria, and skeletal abnormalities." Proc Natl Acad Sci U S A **95**(9): 5372-7.
- Beck, L., Y. Soumounou, et al. (1997). "Pex/PEX tissue distribution and evidence for a deletion in the 3' region of the Pex gene in X-linked hypophosphatemic mice." J Clin Invest **99**(6): 1200-9.
- Beck, L., H. S. Tenenhouse, et al. (1996). "Renal expression of Na⁺-phosphate cotransporter mRNA and protein: effect of the Gy mutation and low phosphate diet." Pflugers Arch **431**(6): 936-41.
- Ben-Dov, I. Z., H. Galitzer, et al. (2007). "The parathyroid is a target organ for FGF23 in rats." J Clin Invest **117**(12): 4003-8.
- Benet-Pages, A., B. Lorenz-Depiereux, et al. (2004). "FGF23 is processed by proprotein convertases but not by PHEX." Bone **35**(2): 455-62.
- Benet-Pages, A., P. Orlik, et al. (2005). "An FGF23 missense mutation causes familial tumoral calcinosis with hyperphosphatemia." Hum Mol Genet **14**(3): 385-90.
- Bennett, C. N., K. A. Longo, et al. (2005). "Regulation of osteoblastogenesis and bone mass by Wnt10b." Proc Natl Acad Sci U S A **102**(9): 3324-9.
- Bennett, J. H., S. Moffatt, et al. (2001). "Cell adhesion molecules in human osteoblasts: structure and function." Histol Histopathol **16**(2): 603-11.
- Benoit, A., M. A. Vargas, et al. (2004). "Endothelin-converting enzyme-like 1 (ECE1) is present both in the plasma membrane and in the endoplasmic reticulum." Biochem J **380**(Pt 3): 881-8.
- Beraud, G., P. Perimenis, et al. (2005). "[Genetic hypophosphatemia: recent advances in physiopathogenic concept]." Ann Endocrinol (Paris) **66**(2 Pt 1): 109-16.
- Berndt, T., T. A. Craig, et al. (2003). "Secreted frizzled-related protein 4 is a potent tumor-derived phosphaturic agent." J Clin Invest **112**(5): 785-94.
- Berndt, T. J., B. Bialesz, et al. (2006). "Secreted frizzled-related protein-4 reduces sodium-phosphate co-transporter abundance and activity in proximal tubule cells." Pflugers Arch **451**(4): 579-87.

- Berndt, T. J., T. A. Craig, et al. (2007). "Biological activity of FGF-23 fragments." Pflugers Arch **454**(4): 615-23.
- Bethune, J., F. Wieland, et al. (2006). "COPI-mediated transport." J Membr Biol **211**(2): 65-79.
- Bi, W., J. M. Deng, et al. (1999). "Sox9 is required for cartilage formation." Nat Genet **22**(1): 85-9.
- Bianchetti, L., C. Oudet, et al. (2002). "M13 endopeptidases: New conserved motifs correlated with structure, and simultaneous phylogenetic occurrence of PHEX and the bony fish." Proteins **47**(4): 481-8.
- Biber, J., M. Custer, et al. (1993). "Localization of NaPi-1, a Na/Pi cotransporter, in rabbit kidney proximal tubules. II. Localization by immunohistochemistry." Pflugers Arch **424**(3-4): 210-5.
- Boileau, G., H. S. Tenenhouse, et al. (2001). "Characterization of PHEX endopeptidase catalytic activity: identification of parathyroid-hormone-related peptide107-139 as a substrate and osteocalcin, PPi and phosphate as inhibitors." Biochem J **355**(Pt 3): 707-13.
- Boll, W., I. Rapoport, et al. (2002). "The mu2 subunit of the clathrin adaptor AP-2 binds to FDNPVY and YppO sorting signals at distinct sites." Traffic **3**(8): 590-600.
- Bonewald, L. F. and M. L. Johnson (2008). "Osteocytes, mechanosensing and Wnt signaling." Bone **42**(4): 606-15.
- Bonifacino, J. S. and L. M. Traub (2003). "Signals for sorting of transmembrane proteins to endosomes and lysosomes." Annu Rev Biochem **72**: 395-447.
- Bonnet, N., K. N. Standley, et al. (2009). "The matricellular protein periostin is required for sost inhibition and the anabolic response to mechanical loading and physical activity." J Biol Chem **284**(51): 35939-50.
- Bornstein, P., A. Agah, et al. (2004). "The role of thrombospondins 1 and 2 in the regulation of cell-matrix interactions, collagen fibril formation, and the response to injury." Int J Biochem Cell Biol **36**(6): 1115-25.

- Bos, K., C. Wraight, et al. (1993). "TGN38 is maintained in the trans-Golgi network by a tyrosine-containing motif in the cytoplasmic domain." Embo J **12**(5): 2219-28.
- Boskey, A. L., B. D. Boyan, et al. (1997). "Matrix vesicles promote mineralization in a gelatin gel." Calcif Tissue Int **60**(3): 309-15.
- Boskey, A. L., L. Spevak, et al. (2002). "Osteopontin deficiency increases mineral content and mineral crystallinity in mouse bone." Calcif Tissue Int **71**(2): 145-54.
- Bostrom, K., D. Tsao, et al. (2001). "Matrix GLA protein modulates differentiation induced by bone morphogenetic protein-2 in C3H10T1/2 cells." J Biol Chem **276**(17): 14044-52.
- Bowe, A. E., R. Finnegan, et al. (2001). "FGF-23 inhibits renal tubular phosphate transport and is a PHEX substrate." Biochem Biophys Res Commun **284**(4): 977-81.
- Boyden, L. M., J. Mao, et al. (2002). "High bone density due to a mutation in LDL-receptor-related protein 5." N Engl J Med **346**(20): 1513-21.
- Brenza, H. L. and H. F. DeLuca (2000). "Regulation of 25-hydroxyvitamin D3 1alpha-hydroxylase gene expression by parathyroid hormone and 1,25-dihydroxyvitamin D3." Arch Biochem Biophys **381**(1): 143-52.
- Brewer, A. J., L. Canaff, et al. (2004). "Differential regulation of PHEX expression in bone and parathyroid gland by chronic renal insufficiency and 1,25-dihydroxyvitamin D3." Am J Physiol Renal Physiol **286**(4): F739-48.
- Bridgewater, L. C., V. Lefebvre, et al. (1998). "Chondrocyte-specific enhancer elements in the Col11a2 gene resemble the Col2a1 tissue-specific enhancer." J Biol Chem **273**(24): 14998-5006.
- Brown, D. A. and J. K. Rose (1992). "Sorting of GPI-anchored proteins to glycolipid-enriched membrane subdomains during transport to the apical cell surface." Cell **68**(3): 533-44.
- Brunner, T., R. J. Mogil, et al. (1995). "Cell-autonomous Fas (CD95)/Fas-ligand interaction mediates activation-induced apoptosis in T-cell hybridomas." Nature **373**(6513): 441-4.

- Burger, E. H. and J. Klein-Nulend (1999). "Mechanotransduction in bone--role of the lacuno-canalicular network." FASEB J **13 Suppl**: S101-12.
- Burger, E. H., J. Klein-Nulend, et al. (2003). "Strain-derived canalicular fluid flow regulates osteoclast activity in a remodelling osteon--a proposal." J Biomech **36**(10): 1453-9.
- Busch, A. E., A. Schuster, et al. (1996). "Expression of a renal type I sodium/phosphate transporter (NaPi-1) induces a conductance in *Xenopus* oocytes permeable for organic and inorganic anions." Proc Natl Acad Sci U S A **93**(11): 5347-51.
- Cai, Q., S. F. Hodgson, et al. (1994). "Brief report: inhibition of renal phosphate transport by a tumor product in a patient with oncogenic osteomalacia." N Engl J Med **330**(23): 1645-9.
- Cailler, F., J. P. Zappulla, et al. (1999). "The N-terminal segment of endothelin-converting enzyme (ECE)-1b contains a di-leucine motif that can redirect neprilysin to an intracellular compartment in Madin-Darby canine kidney (MDCK) cells." Biochem J **341** (Pt 1): 119-26.
- Campos, M., C. Couture, et al. (2003). "Human recombinant endopeptidase PHEX has a strict S1' specificity for acidic residues and cleaves peptides derived from fibroblast growth factor-23 and matrix extracellular phosphoglycoprotein." Biochem J **373**(Pt 1): 271-9.
- Cantorna, M. T., C. E. Hayes, et al. (1996). "1,25-Dihydroxyvitamin D3 reversibly blocks the progression of relapsing encephalomyelitis, a model of multiple sclerosis." Proc Natl Acad Sci U S A **93**(15): 7861-4.
- Cantorna, M. T., C. E. Hayes, et al. (1998). "1,25-Dihydroxycholecalciferol inhibits the progression of arthritis in murine models of human arthritis." J Nutr **128**(1): 68-72.
- Carpenter, T. O. (2003). "Oncogenic osteomalacia--a complex dance of factors." N Engl J Med **348**(17): 1705-8.
- Carpenter, T. O., K. C. Moltz, et al. (1998). "Osteocalcin production in primary osteoblast cultures derived from normal and Hyp mice." Endocrinology **139**(1): 35-43.

- Carpenter, T. O. and T. Shiratori (1990). "Renal 25-hydroxyvitamin D-1 alpha-hydroxylase activity and mitochondrial phosphate transport in Hyp mice." Am J Physiol **259**(6 Pt 1): E814-21.
- Carpentier, M., C. Guillemette, et al. (2004). "Reduced fertility in male mice deficient in the zinc metallopeptidase NL1." Mol Cell Biol **24**(10): 4428-37.
- Carpinelli, M. R., I. P. Wicks, et al. (2002). "An ethyl-nitrosourea-induced point mutation in phex causes exon skipping, x-linked hypophosphatemia, and rickets." Am J Pathol **161**(5): 1925-33.
- Chung, U. I., B. Lanske, et al. (1998). "The parathyroid hormone/parathyroid hormone-related peptide receptor coordinates endochondral bone development by directly controlling chondrocyte differentiation." Proc Natl Acad Sci U S A **95**(22): 13030-5.
- Chung, U. I., E. Schipani, et al. (2001). "Indian hedgehog couples chondrogenesis to osteogenesis in endochondral bone development." J Clin Invest **107**(3): 295-304.
- Collins, J. F., L. Bai, et al. (2004). "The SLC20 family of proteins: dual functions as sodium-phosphate cotransporters and viral receptors." Pflugers Arch **447**(5): 647-52.
- Colnot, C., C. Lu, et al. (2004). "Distinguishing the contributions of the perichondrium, cartilage, and vascular endothelium to skeletal development." Dev Biol **269**(1): 55-69.
- Contreras, I., Y. Yang, et al. (2004). "Sorting signals in the cytosolic tail of plant p24 proteins involved in the interaction with the COPII coat." Plant Cell Physiol **45**(12): 1779-86.
- Cosson, P., Y. Lefkir, et al. (1998). "New COP1-binding motifs involved in ER retrieval." Embo J **17**(23): 6863-70.
- Crine, P., N. Dion, et al. (1997). Endopeptidase-24.11. Oxford, BIOS scientific publisher Ltd.
- Cundy, T., M. Hegde, et al. (2002). "A mutation in the gene TNFRSF11B encoding osteoprotegerin causes an idiopathic hyperphosphatasia phenotype." Hum Mol Genet **11**(18): 2119-27.

- Custer, M., M. Lotscher, et al. (1994). "Expression of Na-P(i) cotransport in rat kidney: localization by RT-PCR and immunohistochemistry." Am J Physiol **266**(5 Pt 2): F767-74.
- Custer, M., F. Meier, et al. (1993). "Localization of NaPi-1, a Na-Pi cotransporter, in rabbit kidney proximal tubules. I. mRNA localization by reverse transcription/polymerase chain reaction." Pflugers Arch **424**(3-4): 203-9.
- Darnay, B. G., J. Ni, et al. (1999). "Activation of NF-kappaB by RANK requires tumor necrosis factor receptor-associated factor (TRAF) 6 and NF-kappaB-inducing kinase. Identification of a novel TRAF6 interaction motif." J Biol Chem **274**(12): 7724-31.
- Darwish, H. M. and H. F. DeLuca (1999). "Identification of a transcription factor that binds to the promoter region of the human parathyroid hormone gene." Arch Biochem Biophys **365**(1): 123-30.
- Day, T. F., X. Guo, et al. (2005). "Wnt/beta-catenin signaling in mesenchymal progenitors controls osteoblast and chondrocyte differentiation during vertebrate skeletogenesis." Dev Cell **8**(5): 739-50.
- De Beur, S. M., R. B. Finnegan, et al. (2002). "Tumors associated with oncogenic osteomalacia express genes important in bone and mineral metabolism." J Bone Miner Res **17**(6): 1102-10.
- De Luca, F., K. M. Barnes, et al. (2001). "Regulation of growth plate chondrogenesis by bone morphogenetic protein-2." Endocrinology **142**(1): 430-6.
- Delany, A. M., M. Amling, et al. (2000). "Osteopenia and decreased bone formation in osteonectin-deficient mice." J Clin Invest **105**(9): 1325.
- Deng, C., A. Wynshaw-Boris, et al. (1996). "Fibroblast growth factor receptor 3 is a negative regulator of bone growth." Cell **84**(6): 911-21.
- Deng, C. X., A. Wynshaw-Boris, et al. (1994). "Murine FGFR-1 is required for early postimplantation growth and axial organization." Genes Dev **8**(24): 3045-57.
- Derby, M. C. and P. A. Gleeson (2007). "New insights into membrane trafficking and protein sorting." Int Rev Cytol **261**: 47-116.

- Dominguez, M., K. Dejgaard, et al. (1998). "gp25L/emp24/p24 protein family members of the cis-Golgi network bind both COP I and II coatomer." J Cell Biol **140**(4): 751-65.
- Doty, S. B. (1981). "Morphological evidence of gap junctions between bone cells." Calcif Tissue Int **33**(5): 509-12.
- Douglas, T., S. Heinemann, et al. (2006). "Fibrillogenesis of collagen types I, II, and III with small leucine-rich proteoglycans decorin and biglycan." Biomacromolecules **7**(8): 2388-93.
- Douglas, T., S. Heinemann, et al. (2007). "Characterization of collagen II fibrils containing biglycan and their effect as a coating on osteoblast adhesion and proliferation." J Mater Sci Mater Med.
- Du, L., M. Desbarats, et al. (1996). "cDNA cloning of the murine Pex gene implicated in X-linked hypophosphatemia and evidence for expression in bone." Genomics **36**(1): 22-8.
- Ducy, P., C. Desbois, et al. (1996). "Increased bone formation in osteocalcin-deficient mice." Nature **382**(6590): 448-52.
- Ducy, P., R. Zhang, et al. (1997). "Osf2/Cbfa1: a transcriptional activator of osteoblast differentiation." Cell **89**(5): 747-54.
- Ecarot-Charrier, B., F. H. Glorieux, et al. (1988). "Defective bone formation by transplanted Hyp mouse bone cells into normal mice." Endocrinology **123**(2): 768-73.
- Ecarot, B. and M. Desbarats (1999). "1,25-(OH)₂D₃ down-regulates expression of Phex, a marker of the mature osteoblast." Endocrinology **140**(3): 1192-9.
- Ecarot, B., F. H. Glorieux, et al. (1992). "Defective bone formation by Hyp mouse bone cells transplanted into normal mice: evidence in favor of an intrinsic osteoblast defect." J Bone Miner Res **7**(2): 215-20.
- Econs, M. J. and M. K. Drezner (1994). "Tumor-induced osteomalacia--unveiling a new hormone." N Engl J Med **330**(23): 1679-81.
- Econs, M. J. and P. T. McEnery (1997). "Autosomal dominant hypophosphatemic rickets/osteomalacia: clinical characterization of a

- novel renal phosphate-wasting disorder." J Clin Endocrinol Metab **82**(2): 674-81.
- Eicher, E. M., J. L. Southard, et al. (1976). "Hypophosphatemia: mouse model for human familial hypophosphatemic (vitamin D-resistant) rickets." Proc Natl Acad Sci U S A **73**(12): 4667-71.
- Ellgaard, L. and A. Helenius (2003). "Quality control in the endoplasmic reticulum." Nat Rev Mol Cell Biol **4**(3): 181-91.
- Erben, R. G., D. Mayer, et al. (2005). "Overexpression of human PHEX under the human beta-actin promoter does not fully rescue the Hyp mouse phenotype." J Bone Miner Res **20**(7): 1149-60.
- Fedde, K. N., L. Blair, et al. (1999). "Alkaline phosphatase knock-out mice recapitulate the metabolic and skeletal defects of infantile hypophosphatasia." J Bone Miner Res **14**(12): 2015-26.
- Feng, J. Q., L. M. Ward, et al. (2006). "Loss of DMP1 causes rickets and osteomalacia and identifies a role for osteocytes in mineral metabolism." Nat Genet **38**(11): 1310-5.
- Ferrari, S. L., J. P. Bonjour, et al. (2005). "Fibroblast growth factor-23 relationship to dietary phosphate and renal phosphate handling in healthy young men." J Clin Endocrinol Metab **90**(3): 1519-24.
- Feskanich, D., W. C. Willett, et al. (2003). "Calcium, vitamin D, milk consumption, and hip fractures: a prospective study among postmenopausal women." Am J Clin Nutr **77**(2): 504-11.
- Fiedler, K., R. G. Parton, et al. (1994). "VIP36, a novel component of glycolipid rafts and exocytic carrier vesicles in epithelial cells." Embo J **13**(7): 1729-40.
- Fiedler, K., M. Veit, et al. (1996). "Bimodal interaction of coatamer with the p24 family of putative cargo receptors." Science **273**(5280): 1396-9.
- Fleischmann, A., F. Hafezi, et al. (2000). "Fra-1 replaces c-Fos-dependent functions in mice." Genes Dev **14**(21): 2695-700.
- Folsch, H., H. Ohno, et al. (1999). "A novel clathrin adaptor complex mediates basolateral targeting in polarized epithelial cells." Cell **99**(2): 189-98.

- Folsch, H., M. Pypaert, et al. (2001). "Distribution and function of AP-1 clathrin adaptor complexes in polarized epithelial cells." J Cell Biol **152**(3): 595-606.
- Forster, I. C., D. D. Loo, et al. (1999). "Stoichiometry and Na⁺ binding cooperativity of rat and flounder renal type II Na⁺-Pi cotransporters." Am J Physiol **276**(4 Pt 2): F644-9.
- Foster, L. J., P. A. Zeemann, et al. (2005). "Differential expression profiling of membrane proteins by quantitative proteomics in a human mesenchymal stem cell line undergoing osteoblast differentiation." Stem Cells **23**(9): 1367-77.
- Francis, F., T. M. Strom, et al. (1997). "Genomic organization of the human PEX gene mutated in X-linked dominant hypophosphatemic rickets." Genome Res **7**(6): 573-85.
- Francis, M. J., E. E. Jones, et al. (1999). "Identification of a di-leucine motif within the C terminus domain of the Menkes disease protein that mediates endocytosis from the plasma membrane." J Cell Sci **112** (Pt 11): 1721-32.
- Franz-Oodendaal, T. A., B. K. Hall, et al. (2006). "Buried alive: how osteoblasts become osteocytes." Dev Dyn **235**(1): 176-90.
- Franzoso, G., L. Carlson, et al. (1997). "Requirement for NF-kappaB in osteoclast and B-cell development." Genes Dev **11**(24): 3482-96.
- Frishberg, Y., N. Ito, et al. (2007). "Hyperostosis-hyperphosphatemia syndrome: a congenital disorder of O-glycosylation associated with augmented processing of fibroblast growth factor 23." J Bone Miner Res **22**(2): 235-42.
- Fujikawa, Y., J. M. Quinn, et al. (1996). "The human osteoclast precursor circulates in the monocyte fraction." Endocrinology **137**(9): 4058-60.
- Fujiwara, I., R. Aravindan, et al. (2003). "Abnormal regulation of renal 25-hydroxyvitamin D-1alpha-hydroxylase activity in X-linked hypophosphatemia: a translational or post-translational defect." J Bone Miner Res **18**(3): 434-42.

- Fukuda, T., K. Kanomata, et al. (2007). "FGF23 induces expression of two isoforms of NAB2, which are corepressors of Egr-1." Biochem Biophys Res Commun **353**(1): 147-51.
- Futter, C. E., A. Gibson, et al. (1998). "In polarized MDCK cells basolateral vesicles arise from clathrin-gamma-adaptin-coated domains on endosomal tubules." J Cell Biol **141**(3): 611-23.
- Galibert, L., M. E. Tometsko, et al. (1998). "The involvement of multiple tumor necrosis factor receptor (TNFR)-associated factors in the signaling mechanisms of receptor activator of NF-kappaB, a member of the TNFR superfamily." J Biol Chem **273**(51): 34120-7.
- Garabedian, M., M. F. Holick, et al. (1972). "Control of 25-hydroxycholecalciferol metabolism by parathyroid glands." Proc Natl Acad Sci U S A **69**(7): 1673-6.
- Garabedian, M., Y. Tanaka, et al. (1974). "Response of intestinal calcium transport and bone calcium mobilization to 1,25-dihydroxyvitamin D3 in thyroparathyroidectomized rats." Endocrinology **94**(4): 1022-7.
- Garimella, R., X. Bi, et al. (2006). "Nature of phosphate substrate as a major determinant of mineral type formed in matrix vesicle-mediated in vitro mineralization: An FTIR imaging study." Bone **38**(6): 811-7.
- Garringer, H. J., C. Fisher, et al. (2006). "The role of mutant UDP-N-acetyl-alpha-D-galactosamine-polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase 3 in regulating serum intact fibroblast growth factor 23 and matrix extracellular phosphoglycoprotein in heritable tumoral calcinosis." J Clin Endocrinol Metab **91**(10): 4037-42.
- Gaynor, E. C. and S. D. Emr (1997). "COPI-independent anterograde transport: cargo-selective ER to Golgi protein transport in yeast COPI mutants." J Cell Biol **136**(4): 789-802.
- Gazit, D., M. Tieder, et al. (1991). "Osteomalacia in hereditary hypophosphatemic rickets with hypercalciuria: a correlative clinical-histomorphometric study." J Clin Endocrinol Metab **72**(1): 229-35.
- Gelb, B. D., G. P. Shi, et al. (1996). "Pycnodysostosis, a lysosomal disease caused by cathepsin K deficiency." Science **273**(5279): 1236-8.

- Geoffroy, V., M. Kneissel, et al. (2002). "High bone resorption in adult aging transgenic mice overexpressing cbfa1/runx2 in cells of the osteoblastic lineage." Mol Cell Biol **22**(17): 6222-33.
- Ghaddar, G., A. F. Ruchon, et al. (2000). "Molecular cloning and biochemical characterization of a new mouse testis soluble-zinc-metallopeptidase of the neprilysin family." Biochem J **347**(Pt 2): 419-29.
- Giraud, C. G. and H. J. Maccioni (2003). "Endoplasmic reticulum export of glycosyltransferases depends on interaction of a cytoplasmic dibasic motif with Sar1." Mol Biol Cell **14**(9): 3753-66.
- Glass, D. A., 2nd and G. Karsenty (2006). "Molecular bases of the regulation of bone remodeling by the canonical Wnt signaling pathway." Curr Top Dev Biol **73**: 43-84.
- Gleeson, P. A. (1998). "Targeting of proteins to the Golgi apparatus." Histochem Cell Biol **109**(5-6): 517-32.
- Goetz, R., A. Beenken, et al. (2007). "Molecular insights into the klotho-dependent, endocrine mode of action of fibroblast growth factor 19 subfamily members." Mol Cell Biol **27**(9): 3417-28.
- Goldberg, M., D. Septier, et al. (2006). "Fibromodulin-deficient mice display impaired collagen fibrillogenesis in predentin as well as altered dentin mineralization and enamel formation." J Histochem Cytochem **54**(5): 525-37.
- Gowen, L. C., D. N. Petersen, et al. (2003). "Targeted disruption of the osteoblast/osteocyte factor 45 gene (OF45) results in increased bone formation and bone mass." J Biol Chem **278**(3): 1998-2007.
- Gregory, C. A., W. G. Gunn, et al. (2004). "An Alizarin red-based assay of mineralization by adherent cells in culture: comparison with cetylpyridinium chloride extraction." Anal Biochem **329**(1): 77-84.
- Grieff, M., S. Mumm, et al. (1997). "Expression and cloning of the human X-linked hypophosphatemia gene cDNA." Biochem Biophys Res Commun **231**(3): 635-9.
- Grigoriadis, A. E., J. N. Heersche, et al. (1988). "Differentiation of muscle, fat, cartilage, and bone from progenitor cells present in a bone-derived

- clonal cell population: effect of dexamethasone." J Cell Biol **106**(6): 2139-51.
- Grigoriadis, A. E., Z. Q. Wang, et al. (1994). "c-Fos: a key regulator of osteoclast-macrophage lineage determination and bone remodeling." Science **266**(5184): 443-8.
- Grzesik, W. J. and P. G. Robey (1994). "Bone matrix RGD glycoproteins: immunolocalization and interaction with human primary osteoblastic bone cells in vitro." J Bone Miner Res **9**(4): 487-96.
- Guo, R., S. Liu, et al. (2001). "Analysis of recombinant Phex: an endopeptidase in search of a substrate." Am J Physiol Endocrinol Metab **281**(4): E837-47.
- Guo, R. and L. D. Quarles (1997). "Cloning and sequencing of human PEX from a bone cDNA library: evidence for its developmental stage-specific regulation in osteoblasts." J Bone Miner Res **12**(7): 1009-17.
- Guo, R., P. S. Rowe, et al. (2002). "Inhibition of MEPE cleavage by Phex." Biochem Biophys Res Commun **297**(1): 38-45.
- Gupta, A., H. S. Tenenhouse, et al. (2001). "Identification of the type II Na(+)-Pi cotransporter (Npt2) in the osteoclast and the skeletal phenotype of Npt2^{-/-} mice." Bone **29**(5): 467-76.
- Gurkan, C., S. M. Stagg, et al. (2006). "The COPII cage: unifying principles of vesicle coat assembly." Nat Rev Mol Cell Biol **7**(10): 727-38.
- Hall, B. K. and T. Miyake (1995). Divide, accumulate, differentiate: cell condensation in skeletal development revisited. Int J Dev Biol. **39**: 881-93.
- Hall, B. K. and T. Miyake (2000). "All for one and one for all: condensations and the initiation of skeletal development." Bioessays **22**(2): 138-47.
- Harmey, D., L. Hesse, et al. (2004). "Concerted regulation of inorganic pyrophosphate and osteopontin by akp2, enpp1, and ank: an integrated model of the pathogenesis of mineralization disorders." Am J Pathol **164**(4): 1199-209.
- Hassan, M. Q., A. Javed, et al. (2004). "Dlx3 transcriptional regulation of osteoblast differentiation: temporal recruitment of Msx2, Dlx3, and

- Dlx5 homeodomain proteins to chromatin of the osteocalcin gene." Mol Cell Biol **24**(20): 9248-61.
- Hay, E., J. Lemonnier, et al. (2000). "N- and E-cadherin mediate early human calvaria osteoblast differentiation promoted by bone morphogenetic protein-2." J Cell Physiol **183**(1): 117-28.
- Hayashibara, T., T. Hiraga, et al. (2004). "A synthetic peptide fragment of human MEPE stimulates new bone formation in vitro and in vivo." J Bone Miner Res **19**(3): 455-62.
- Hazenbergh, J. G., D. Taylor, et al. (2007). "The role of osteocytes and bone microstructure in preventing osteoporotic fractures." Osteoporos Int **18**(1): 1-8.
- Heino, T. J., K. Kurata, et al. (2009). "Evidence for the role of osteocytes in the initiation of targeted remodeling." Technol Health Care **17**(1): 49-56.
- Henthorn, P. S., M. Raducha, et al. (1992). "Different missense mutations at the tissue-nonspecific alkaline phosphatase gene locus in autosomal recessively inherited forms of mild and severe hypophosphatasia." Proc Natl Acad Sci U S A **89**(20): 9924-8.
- Hessle, L., K. A. Johnson, et al. (2002). "Tissue-nonspecific alkaline phosphatase and plasma cell membrane glycoprotein-1 are central antagonistic regulators of bone mineralization." Proc Natl Acad Sci U S A **99**(14): 9445-9.
- Hilfiker, H., O. Hattenhauer, et al. (1998). "Characterization of a murine type II sodium-phosphate cotransporter expressed in mammalian small intestine." Proc Natl Acad Sci U S A **95**(24): 14564-9.
- Hill, T. P., D. Spater, et al. (2005). "Canonical Wnt/beta-catenin signaling prevents osteoblasts from differentiating into chondrocytes." Dev Cell **8**(5): 727-38.
- Hille-Rehfeld, A. (1995). "Mannose 6-phosphate receptors in sorting and transport of lysosomal enzymes." Biochim Biophys Acta **1241**(2): 177-94.
- Hines, E. R., J. F. Collins, et al. (2000). "Molecular cloning of the murine PHEX gene promoter." Biochim Biophys Acta **1493**(3): 333-6.

- Hines, E. R., J. F. Collins, et al. (2002). "Glucocorticoid regulation of the murine PHEX gene." Am J Physiol Renal Physiol **283**(2): F356-63.
- Hirschman, A., D. Deutsch, et al. (1983). "Neutral peptidase activities in matrix vesicles from bovine fetal alveolar bone and dog osteosarcoma." Calcif Tissue Int **35**(6): 791-7.
- Ho, A. M., M. D. Johnson, et al. (2000). "Role of the mouse ank gene in control of tissue calcification and arthritis." Science **289**(5477): 265-70.
- Hofbauer, L. C. and M. Schoppet (2002). "Osteoprotegerin deficiency and juvenile Paget's disease." N Engl J Med **347**(20): 1622-3; author reply 1622-3.
- Honegger, K. J., P. Capuano, et al. (2006). "Regulation of sodium-proton exchanger isoform 3 (NHE3) by PKA and exchange protein directly activated by cAMP (EPAC)." Proc Natl Acad Sci U S A **103**(3): 803-8.
- Hu, H., M. J. Hilton, et al. (2005). "Sequential roles of Hedgehog and Wnt signaling in osteoblast development." Development **132**(1): 49-60.
- Hu, T., C. Y. Kao, et al. (1999). "Inhibition of secretion by 1,3-Cyclohexanebis(methylamine), a dibasic compound that interferes with coatamer function." Mol Biol Cell **10**(4): 921-33.
- Hubmacher, D., K. Tiedemann, et al. (2006). "Fibrillins: from biogenesis of microfibrils to signaling functions." Curr Top Dev Biol **75**: 93-123.
- Ijiri, K., L. F. Zerbini, et al. (2005). "A novel role for GADD45beta as a mediator of MMP-13 gene expression during chondrocyte terminal differentiation." J Biol Chem **280**(46): 38544-55.
- Inada, M., Y. Wang, et al. (2004). "Critical roles for collagenase-3 (Mmp13) in development of growth plate cartilage and in endochondral ossification." Proc Natl Acad Sci U S A **101**(49): 17192-7.
- Inada, M., T. Yasui, et al. (1999). "Maturation disturbance of chondrocytes in Cbfa1-deficient mice." Dev Dyn **214**(4): 279-90.
- Ishida, N., K. Hayashi, et al. (2002). "Large scale gene expression analysis of osteoclastogenesis in vitro and elucidation of NFAT2 as a key regulator." J Biol Chem **277**(43): 41147-56.

- Ito, M., Y. Sakai, et al. (2005). "Vitamin D and phosphate regulate fibroblast growth factor-23 in K-562 cells." Am J Physiol Endocrinol Metab **288**(6): E1101-9.
- Iwase, A., R. Shen, et al. (2004). "Direct binding of neutral endopeptidase 24.11 to ezrin/radixin/moesin (ERM) proteins competes with the interaction of CD44 with ERM proteins." J Biol Chem **279**(12): 11898-905.
- Iwata, T., L. Chen, et al. (2000). "A neonatal lethal mutation in FGFR3 uncouples proliferation and differentiation of growth plate chondrocytes in embryos." Hum Mol Genet **9**(11): 1603-13.
- Jain, A., N. S. Fedarko, et al. (2004). "Serum levels of matrix extracellular phosphoglycoprotein (MEPE) in normal humans correlate with serum phosphorus, parathyroid hormone and bone mineral density." J Clin Endocrinol Metab **89**(8): 4158-61.
- Jesudason, D., A. G. Need, et al. (2002). "Relationship between serum 25-hydroxyvitamin D and bone resorption markers in vitamin D insufficiency." Bone **31**(5): 626-30.
- Johnson, K., J. Goding, et al. (2003). "Linked deficiencies in extracellular PP(i) and osteopontin mediate pathologic calcification associated with defective PC-1 and ANK expression." J Bone Miner Res **18**(6): 994-1004.
- Johnson, K., A. Moffa, et al. (1999). "Matrix vesicle plasma cell membrane glycoprotein-1 regulates mineralization by murine osteoblastic MC3T3 cells." J Bone Miner Res **14**(6): 883-92.
- Jones, B. G., L. Thomas, et al. (1995). "Intracellular trafficking of furin is modulated by the phosphorylation state of a casein kinase II site in its cytoplasmic tail." Embo J **14**(23): 5869-83.
- Jones, G., S. A. Strugnell, et al. (1998). "Current understanding of the molecular actions of vitamin D." Physiol Rev **78**(4): 1193-231.
- Jonsson, K. B., R. Zahradnik, et al. (2003). "Fibroblast growth factor 23 in oncogenic osteomalacia and X-linked hypophosphatemia." N Engl J Med **348**(17): 1656-63.

- Ju, S. T., D. J. Panka, et al. (1995). "Fas(CD95)/FasL interactions required for programmed cell death after T-cell activation." Nature **373**(6513): 444-8.
- Kanatani, N., T. Fujita, et al. (2006). "Cbf beta regulates Runx2 function isoform-dependently in postnatal bone development." Dev Biol **296**(1): 48-61.
- Kang, J. S., T. Alliston, et al. (2005). "Repression of Runx2 function by TGF-beta through recruitment of class II histone deacetylases by Smad3." Embo J **24**(14): 2543-55.
- Karsenty, G. and E. F. Wagner (2002). "Reaching a genetic and molecular understanding of skeletal development." Dev Cell **2**(4): 389-406.
- Kato, K., C. Jeanneau, et al. (2006). "Polypeptide GalNAc-transferase T3 and familial tumoral calcinosis. Secretion of fibroblast growth factor 23 requires O-glycosylation." J Biol Chem **281**(27): 18370-7.
- Kavanaugh, M. P. and D. Kabat (1996). "Identification and characterization of a widely expressed phosphate transporter/retrovirus receptor family." Kidney Int **49**(4): 959-63.
- Kavanaugh, M. P., D. G. Miller, et al. (1994). "Cell-surface receptors for gibbon ape leukemia virus and amphotropic murine retrovirus are inducible sodium-dependent phosphate symporters." Proc Natl Acad Sci U S A **91**(15): 7071-5.
- Kawata, T., Y. Imanishi, et al. (2007). "Parathyroid hormone regulates fibroblast growth factor-23 in a mouse model of primary hyperparathyroidism." J Am Soc Nephrol **18**(10): 2683-8.
- Keusch, I., M. Traebert, et al. (1998). "Parathyroid hormone and dietary phosphate provoke a lysosomal routing of the proximal tubular Na/Pi-cotransporter type II." Kidney Int **54**(4): 1224-32.
- Khadeer, M. A., Z. Tang, et al. (2003). "Na⁺-dependent phosphate transporters in the murine osteoclast: cellular distribution and protein interactions." Am J Physiol Cell Physiol **284**(6): C1633-44.
- Kim, Y. J., H. N. Kim, et al. (2006). "The bone-related Zn finger transcription factor Osterix promotes proliferation of mesenchymal cells." Gene **366**(1): 145-51.

- Kimmel-Jehan, C., H. M. Darwish, et al. (1999). "DNA bending is induced by binding of vitamin D receptor-retinoid X receptor heterodimers to vitamin D response elements." J Cell Biochem **74**(2): 220-8.
- Kirsch, T., G. Harrison, et al. (2000). "The roles of annexins and types II and X collagen in matrix vesicle-mediated mineralization of growth plate cartilage." J Biol Chem **275**(45): 35577-83.
- Kirsch, T., H. D. Nah, et al. (1997). "Regulated production of mineralization-competent matrix vesicles in hypertrophic chondrocytes." J Cell Biol **137**(5): 1149-60.
- Knudson, C. B. and B. P. Toole (1987). "Hyaluronate-cell interactions during differentiation of chick embryo limb mesoderm." Dev Biol **124**(1): 82-90.
- Kobayashi, T. and H. Kronenberg (2005). "Minireview: transcriptional regulation in development of bone." Endocrinology **146**(3): 1012-7.
- Kolek, O. I., E. R. Hines, et al. (2005). "1alpha,25-Dihydroxyvitamin D3 upregulates FGF23 gene expression in bone: the final link in a renal-gastrointestinal-skeletal axis that controls phosphate transport." Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol **289**(6): G1036-42.
- Komori, T. (2005). "Regulation of skeletal development by the Runx family of transcription factors." J Cell Biochem **95**(3): 445-53.
- Komori, T. (2006). "Regulation of osteoblast differentiation by transcription factors." J Cell Biochem **99**(5): 1233-9.
- Komori, T., H. Yagi, et al. (1997). "Targeted disruption of Cbfa1 results in a complete lack of bone formation owing to maturational arrest of osteoblasts." Cell **89**(5): 755-64.
- Kornfeld, R. and S. Kornfeld (1985). "Assembly of asparagine-linked oligosaccharides." Annu Rev Biochem **54**: 631-64.
- Kotobuki, N., A. Matsushima, et al. (2008). "Small interfering RNA of alkaline phosphatase inhibits matrix mineralization." Cell Tissue Res **332**(2): 279-88.

- Krajsnik, T., P. Bjorklund, et al. (2007). "Fibroblast growth factor-23 regulates parathyroid hormone and 1alpha-hydroxylase expression in cultured bovine parathyroid cells." J Endocrinol **195**(1): 125-31.
- Kronenberg, H. M. (2003). "Developmental regulation of the growth plate." Nature **423**(6937): 332-6.
- Kurihara, T., S. Hamamoto, et al. (2000). "Sec24p and Iss1p function interchangeably in transport vesicle formation from the endoplasmic reticulum in *Saccharomyces cerevisiae*." Mol Biol Cell **11**(3): 983-98.
- Kuro-o, M., Y. Matsumura, et al. (1997). "Mutation of the mouse klotho gene leads to a syndrome resembling ageing." Nature **390**(6655): 45-51.
- Kurosu, H., Y. Ogawa, et al. (2006). "Regulation of fibroblast growth factor-23 signaling by klotho." J Biol Chem **281**(10): 6120-3.
- Lacey, D. L., E. Timms, et al. (1998). "Osteoprotegerin ligand is a cytokine that regulates osteoclast differentiation and activation." Cell **93**(2): 165-76.
- Lanske, B. and M. S. Razzaque (2007). "Premature aging in klotho mutant mice: cause or consequence?" Ageing Res Rev **6**(1): 73-9.
- Larsson, T., S. I. Davis, et al. (2005). "Fibroblast growth factor-23 mutants causing familial tumoral calcinosis are differentially processed." Endocrinology **146**(9): 3883-91.
- Larsson, T., R. Marsell, et al. (2004). "Transgenic mice expressing fibroblast growth factor 23 under the control of the alpha1(I) collagen promoter exhibit growth retardation, osteomalacia, and disturbed phosphate homeostasis." Endocrinology **145**(7): 3087-94.
- Larsson, T., U. Nisbeth, et al. (2003). "Circulating concentration of FGF-23 increases as renal function declines in patients with chronic kidney disease, but does not change in response to variation in phosphate intake in healthy volunteers." Kidney Int **64**(6): 2272-9.
- Larsson, T., R. Zahradnik, et al. (2003). "Immunohistochemical detection of FGF-23 protein in tumors that cause oncogenic osteomalacia." Eur J Endocrinol **148**(2): 269-76.
- Lee, M. C., E. A. Miller, et al. (2004). "Bi-directional protein transport between the ER and Golgi." Annu Rev Cell Dev Biol **20**: 87-123.

- Lee, M. H., Y. J. Kim, et al. (2005). "Dlx5 specifically regulates Runx2 type II expression by binding to homeodomain-response elements in the Runx2 distal promoter." J Biol Chem **280**(42): 35579-87.
- Lefebvre, V., W. Huang, et al. (1997). "SOX9 is a potent activator of the chondrocyte-specific enhancer of the pro alpha1(II) collagen gene." Mol Cell Biol **17**(4): 2336-46.
- Lemire, J. M., A. Ince, et al. (1992). "1,25-Dihydroxyvitamin D3 attenuates the expression of experimental murine lupus of MRL/l mice." Autoimmunity **12**(2): 143-8.
- Letourneur, F., E. C. Gaynor, et al. (1994). "Coatomer is essential for retrieval of dilysine-tagged proteins to the endoplasmic reticulum." Cell **79**(7): 1199-207.
- Levi, M., M. Lotscher, et al. (1994). "Cellular mechanisms of acute and chronic adaptation of rat renal P(i) transporter to alterations in dietary P(i)." Am J Physiol **267**(5 Pt 2): F900-8.
- Leyns, L., T. Bouwmeester, et al. (1997). "Frzb-1 is a secreted antagonist of Wnt signaling expressed in the Spemann organizer." Cell **88**(6): 747-56.
- Li, J., I. Sarosi, et al. (2000). "RANK is the intrinsic hematopoietic cell surface receptor that controls osteoclastogenesis and regulation of bone mass and calcium metabolism." Proc Natl Acad Sci U S A **97**(4): 1566-71.
- Li, X., M. S. Ominsky, et al. (2008). "Targeted deletion of the sclerostin gene in mice results in increased bone formation and bone strength." J Bone Miner Res **23**(6): 860-9.
- Lian, J. B., G. S. Stein, et al. (2006). "Networks and hubs for the transcriptional control of osteoblastogenesis." Rev Endocr Metab Disord **7**(1-2): 1-16.
- Liang, Z., H. Veeraprame, et al. (2004). "The C-terminus of prenylin is important in forming a dimer conformation necessary for endoplasmic-reticulum-to-Golgi transport." Biochem J **380**(Pt 1): 43-9.
- Lin, C., X. Jiang, et al. (2009). "Sclerostin mediates bone response to mechanical unloading through antagonizing Wnt/beta-catenin signaling." J Bone Miner Res **24**(10): 1651-61.

- Ling, Y., H. F. Rios, et al. (2005). "DMP1 depletion decreases bone mineralization in vivo: an FTIR imaging analysis." J Bone Miner Res **20**(12): 2169-77.
- Lipman, M. L., D. Panda, et al. (1998). "Cloning of human PEX cDNA. Expression, subcellular localization, and endopeptidase activity." J Biol Chem **273**(22): 13729-37.
- Lippincott-Schwartz, J., N. B. Cole, et al. (1998). "Building a secretory apparatus: role of ARF1/COPI in Golgi biogenesis and maintenance." Histochem Cell Biol **109**(5-6): 449-62.
- Little, R. D., R. R. Recker, et al. (2002). "High bone density due to a mutation in LDL-receptor-related protein 5." N Engl J Med **347**(12): 943-4; author reply 943-4.
- Liu, C. J., E. Chang, et al. (2005). "The interferon-inducible p204 protein acts as a transcriptional coactivator of Cbfa1 and enhances osteoblast differentiation." J Biol Chem **280**(4): 2788-96.
- Liu, S., T. A. Brown, et al. (2005). "Role of matrix extracellular phosphoglycoprotein in the pathogenesis of X-linked hypophosphatemia." J Am Soc Nephrol **16**(6): 1645-53.
- Liu, S., R. Guo, et al. (2003). "Regulation of fibroblastic growth factor 23 expression but not degradation by PHEX." J Biol Chem **278**(39): 37419-26.
- Liu, S., R. Guo, et al. (2002). "Overexpression of Phex in osteoblasts fails to rescue the Hyp mouse phenotype." J Biol Chem **277**(5): 3686-97.
- Liu, S., P. S. Rowe, et al. (2007). "Phosphorylated acidic serine-aspartate-rich MEPE-associated motif peptide from matrix extracellular phosphoglycoprotein inhibits phosphate regulating gene with homologies to endopeptidases on the X-chromosome enzyme activity." J Endocrinol **192**(1): 261-7.
- Liu, S., W. Tang, et al. (2006). "Fibroblast growth factor 23 is a counter-regulatory phosphaturic hormone for vitamin D." J Am Soc Nephrol **17**(5): 1305-15.
- Liu, S., J. Zhou, et al. (2006). "Pathogenic role of Fgf23 in Hyp mice." Am J Physiol Endocrinol Metab **291**(1): E38-49.

- Liu, S., J. Zhou, et al. (2008). "Pathogenic role of Fgf23 in Dmp1-null mice." Am J Physiol Endocrinol Metab **295**(2): E254-61.
- Liu, W., S. Toyosawa, et al. (2001). "Overexpression of Cbfa1 in osteoblasts inhibits osteoblast maturation and causes osteopenia with multiple fractures." J Cell Biol **155**(1): 157-66.
- Liu, Z., J. Xu, et al. (2002). "Coordination of chondrogenesis and osteogenesis by fibroblast growth factor 18." Genes Dev **16**(7): 859-69.
- Long, F., X. M. Zhang, et al. (2001). "Genetic manipulation of hedgehog signaling in the endochondral skeleton reveals a direct role in the regulation of chondrocyte proliferation." Development **128**(24): 5099-108.
- Long, J. R., J. L. Dindot, et al. (1998). "A peptide that inhibits hydroxyapatite growth is in an extended conformation on the crystal surface." Proc Natl Acad Sci U S A **95**(21): 12083-7.
- Lorenz-Depiereux, B., M. Bastepe, et al. (2006). "DMP1 mutations in autosomal recessive hypophosphatemia implicate a bone matrix protein in the regulation of phosphate homeostasis." Nat Genet **38**(11): 1248-50.
- Lotscher, M., B. Kaissling, et al. (1997). "Role of microtubules in the rapid regulation of renal phosphate transport in response to acute alterations in dietary phosphate content." J Clin Invest **99**(6): 1302-12.
- Loutit, J. F. and K. M. Townsend (1982). "Longevity of osteoclasts in radiation chimaeras of beige and osteopetrotic microphthalmic mice." Br J Exp Pathol **63**(2): 214-20.
- Lu, C., S. Huang, et al. (2004). "Mepe is expressed during skeletal development and regeneration." Histochem Cell Biol **121**(6): 493-9.
- Lucchini, M., M. L. Couble, et al. (2004). "Alpha v beta 3 integrin expression in human odontoblasts and co-localization with osteoadherin." J Dent Res **83**(7): 552-6.
- Luchin, A., G. Purdom, et al. (2000). "The microphthalmia transcription factor regulates expression of the tartrate-resistant acid phosphatase gene during terminal differentiation of osteoclasts." J Bone Miner Res **15**(3): 451-60.

- Luchin, A., S. Suchting, et al. (2001). "Genetic and physical interactions between Microphthalmia transcription factor and PU.1 are necessary for osteoclast gene expression and differentiation." J Biol Chem **276**(39): 36703-10.
- Lundquist, P., H. Murer, et al. (2007). "Type II Na⁺-Pi cotransporters in osteoblast mineral formation: regulation by inorganic phosphate." Cell Physiol Biochem **19**(1-4): 43-56.
- Luo, G., P. Ducy, et al. (1997). "Spontaneous calcification of arteries and cartilage in mice lacking matrix GLA protein." Nature **386**(6620): 78-81.
- Mahon, M. J., M. Donowitz, et al. (2002). "Na⁽⁺⁾/H⁽⁺⁾ exchanger regulatory factor 2 directs parathyroid hormone 1 receptor signalling." Nature **417**(6891): 858-61.
- Mallette, F. A., S. Goumard, et al. (2004). "Human fibroblasts require the Rb family of tumor suppressors, but not p53, for PML-induced senescence." Oncogene **23**(1): 91-9.
- Marth, J. D. (1996). "Complexity in O-linked oligosaccharide biosynthesis engendered by multiple polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferases." Glycobiology **6**(7): 701-5.
- Matheson, S., H. Larjava, et al. (2005). "Distinctive localization and function for lumican, fibromodulin and decorin to regulate collagen fibril organization in periodontal tissues." J Periodontal Res **40**(4): 312-24.
- Matsumura, Y., H. Aizawa, et al. (1998). "Identification of the human klotho gene and its two transcripts encoding membrane and secreted klotho protein." Biochem Biophys Res Commun **242**(3): 626-30.
- Matsuo, K., J. M. Owens, et al. (2000). "Fosl1 is a transcriptional target of c-Fos during osteoclast differentiation." Nat Genet **24**(2): 184-7.
- Matsuoka, K., Y. Morimitsu, et al. (1998). "Coat assembly directs v-SNARE concentration into synthetic COPII vesicles." Mol Cell **2**(5): 703-8.
- McCauley, L. K., A. J. Koh, et al. (1996). "PTH/PTHrP receptor is temporally regulated during osteoblast differentiation and is associated with collagen synthesis." J Cell Biochem **61**(4): 638-47.

- McHugh, K. P., K. Hodivala-Dilke, et al. (2000). "Mice lacking beta3 integrins are osteosclerotic because of dysfunctional osteoclasts." J Clin Invest **105**(4): 433-40.
- Meyer, R. A., Jr., M. H. Meyer, et al. (1989). "Parabiosis suggests a humoral factor is involved in X-linked hypophosphatemia in mice." J Bone Miner Res **4**(4): 493-500.
- Meyer, R. A., Jr., C. G. Young, et al. (2000). "Effect of age on the expression of Pex (Phex) in the mouse." Calcif Tissue Int **66**(4): 282-7.
- Miao, D., X. Bai, et al. (2001). "Osteomalacia in hyp mice is associated with abnormal phex expression and with altered bone matrix protein expression and deposition." Endocrinology **142**(2): 926-39.
- Miao, D., X. Bai, et al. (2004). "Cartilage abnormalities are associated with abnormal Phex expression and with altered matrix protein and MMP-9 localization in Hyp mice." Bone **34**(4): 638-47.
- Miller, E., B. Antonny, et al. (2002). "Cargo selection into COPII vesicles is driven by the Sec24p subunit." Embo J **21**(22): 6105-13.
- Miller, E. A., T. H. Beilharz, et al. (2003). "Multiple cargo binding sites on the COPII subunit Sec24p ensure capture of diverse membrane proteins into transport vesicles." Cell **114**(4): 497-509.
- Minina, E., C. Kreschel, et al. (2002). "Interaction of FGF, Ihh/Pthlh, and BMP signaling integrates chondrocyte proliferation and hypertrophic differentiation." Dev Cell **3**(3): 439-49.
- Minina, E., H. M. Wenzel, et al. (2001). "BMP and Ihh/PTHrP signaling interact to coordinate chondrocyte proliferation and differentiation." Development **128**(22): 4523-34.
- Mirams, M., B. G. Robinson, et al. (2004). "Bone as a source of FGF23: regulation by phosphate?" Bone **35**(5): 1192-9.
- Miranda, K. C., T. Khromykh, et al. (2001). "A dileucine motif targets E-cadherin to the basolateral cell surface in Madin-Darby canine kidney and LLC-PK1 epithelial cells." J Biol Chem **276**(25): 22565-72.

- Mochida, Y., D. Parisuthiman, et al. (2006). "Biglycan is a positive modulator of BMP-2 induced osteoblast differentiation." Adv Exp Med Biol **585**: 101-13.
- Montessuit, C., J. Caverzasio, et al. (1991). "Characterization of a Pi transport system in cartilage matrix vesicles. Potential role in the calcification process." J Biol Chem **266**(27): 17791-7.
- Morris, D. C., K. Masuhara, et al. (1992). "Immunolocalization of alkaline phosphatase in osteoblasts and matrix vesicles of human fetal bone." Bone Miner **19**(3): 287-98.
- Mossessova, E., L. C. Bickford, et al. (2003). "SNARE selectivity of the COPII coat." Cell **114**(4): 483-95.
- Mossessova, E., R. A. Corpina, et al. (2003). "Crystal structure of ARF1*Sec7 complexed with Brefeldin A and its implications for the guanine nucleotide exchange mechanism." Mol Cell **12**(6): 1403-11.
- Motyckova, G., K. N. Weilbaecher, et al. (2001). "Linking osteopetrosis and pycnodysostosis: regulation of cathepsin K expression by the microphthalmia transcription factor family." Proc Natl Acad Sci U S A **98**(10): 5798-803.
- Moustafa, A., T. Sugiyama, et al. (2009). "The mouse fibula as a suitable bone for the study of functional adaptation to mechanical loading." Bone **44**(5): 930-5.
- Mundlos, S., F. Otto, et al. (1997). "Mutations involving the transcription factor CBFA1 cause cleidocranial dysplasia." Cell **89**(5): 773-9.
- Munro, S. and H. R. Pelham (1987). "A C-terminal signal prevents secretion of luminal ER proteins." Cell **48**(5): 899-907.
- Murshed, M., D. Harmey, et al. (2005). "Unique coexpression in osteoblasts of broadly expressed genes accounts for the spatial restriction of ECM mineralization to bone." Genes Dev **19**(9): 1093-104.
- Murshed, M., T. Schinke, et al. (2004). "Extracellular matrix mineralization is regulated locally; different roles of two gla-containing proteins." J Cell Biol **165**(5): 625-30.

- Nahar, N. N., L. R. Missana, et al. (2008). "Matrix vesicles are carriers of bone morphogenetic proteins (BMPs), vascular endothelial growth factor (VEGF), and noncollagenous matrix proteins." J Bone Miner Metab **26**(5): 514-9.
- Nakajima, M., H. Kizawa, et al. (2007). "Mechanisms for asporin function and regulation in articular cartilage." J Biol Chem **282**(44): 32185-92.
- Nakamura, K., M. Nashimoto, et al. (2001). "Low serum concentrations of 25-hydroxyvitamin D in young adult Japanese women: a cross sectional study." Nutrition **17**(11-12): 921-5.
- Nakashima, K., X. Zhou, et al. (2002). "The novel zinc finger-containing transcription factor osterix is required for osteoblast differentiation and bone formation." Cell **108**(1): 17-29.
- Nampei, A., J. Hashimoto, et al. (2004). "Matrix extracellular phosphoglycoprotein (MEPE) is highly expressed in osteocytes in human bone." J Bone Miner Metab **22**(3): 176-84.
- Narayanan, K., A. Ramachandran, et al. (2003). "Dual functional roles of dentin matrix protein 1. Implications in biomineralization and gene transcription by activation of intracellular Ca²⁺ store." J Biol Chem **278**(19): 17500-8.
- Narayanan, K., R. Srinivas, et al. (2001). "Differentiation of embryonic mesenchymal cells to odontoblast-like cells by overexpression of dentin matrix protein 1." Proc Natl Acad Sci U S A **98**(8): 4516-21.
- Nelson, A. E., R. C. Bligh, et al. (2003). "Clinical case seminar: Fibroblast growth factor 23: a new clinical marker for oncogenic osteomalacia." J Clin Endocrinol Metab **88**(9): 4088-94.
- Nesbitt, T., T. M. Coffman, et al. (1992). "Crosstransplantation of kidneys in normal and Hyp mice. Evidence that the Hyp mouse phenotype is unrelated to an intrinsic renal defect." J Clin Invest **89**(5): 1453-9.
- Nesbitt, T., I. Fujiwara, et al. (1999). "Coordinated maturational regulation of PHEX and renal phosphate transport inhibitory activity: evidence for the pathophysiological role of PHEX in X-linked hypophosphatemia." J Bone Miner Res **14**(12): 2027-35.

- Nishimura, N. and W. E. Balch (1997). "A di-acidic signal required for selective export from the endoplasmic reticulum." Science **277**(5325): 556-8.
- Nishimura, N., S. Bannykh, et al. (1999). "A di-acidic (DXE) code directs concentration of cargo during export from the endoplasmic reticulum." J Biol Chem **274**(22): 15937-46.
- Nufer, O., F. Kappeler, et al. (2003). "ER export of ERGIC-53 is controlled by cooperation of targeting determinants in all three of its domains." J Cell Sci **116**(Pt 21): 4429-40.
- O'Brien, C. A., L. I. Plotkin, et al. (2008). "Control of bone mass and remodeling by PTH receptor signaling in osteocytes." PLoS One **3**(8): e2942.
- O'Kelly, I., M. H. Butler, et al. (2002). "Forward transport. 14-3-3 binding overcomes retention in endoplasmic reticulum by dibasic signals." Cell **111**(4): 577-88.
- Oefner, C., A. D'Arcy, et al. (2000). "Structure of human neutral endopeptidase (Neprilysin) complexed with phosphoramidon." J Mol Biol **296**(2): 341-9.
- Ohbayashi, N., M. Shibayama, et al. (2002). "FGF18 is required for normal cell proliferation and differentiation during osteogenesis and chondrogenesis." Genes Dev **16**(7): 870-9.
- Okawa, A., I. Nakamura, et al. (1998). "Mutation in Npps in a mouse model of ossification of the posterior longitudinal ligament of the spine." Nat Genet **19**(3): 271-3.
- Onishi, T., R. Okawa, et al. (2007). "Phex mutation causes the reduction of npt2b mRNA in teeth." J Dent Res **86**(2): 158-62.
- Orci, L., M. Ravazzola, et al. (1991). "Mammalian Sec23p homologue is restricted to the endoplasmic reticulum transitional cytoplasm." Proc Natl Acad Sci U S A **88**(19): 8611-5.
- Orimo, H., M. Goseki-Sone, et al. (2008). "Functional assay of the mutant tissue-nonspecific alkaline phosphatase gene using U2OS osteoblast-like cells." Mol Genet Metab **94**(3): 375-81.

- Orimo, H., M. Goseki-Sone, et al. (2008). "Functional assay of the mutant tissue-nonspecific alkaline phosphatase gene using U 2 OS osteoblast-like cells." Mol Genet Metab **94**(3): 375-81.
- Orimo, H., Z. Hayashi, et al. (1994). "Novel missense and frameshift mutations in the tissue-nonspecific alkaline phosphatase gene in a Japanese patient with hypophosphatasia." Hum Mol Genet **3**(9): 1683-4.
- Orimo, H. and T. Shimada (2006). "Effects of phosphates on the expression of tissue-nonspecific alkaline phosphatase gene and phosphate-regulating genes in short-term cultures of human osteosarcoma cell lines." Mol Cell Biochem **282**(1-2): 101-8.
- Orimo, H. and T. Shimada (2008). "The role of tissue-nonspecific alkaline phosphatase in the phosphate-induced activation of alkaline phosphatase and mineralization in SaOS-2 human osteoblast-like cells." Mol Cell Biochem **315**(1-2): 51-60.
- Orimo, H. and T. Shimada (2008). "The role of tissue-nonspecific alkaline phosphatase in the phosphate-induced activation of alkaline phosphatase and mineralization in SaOS-2 human osteoblast-like cells." Mol Cell Biochem.
- Ornitz, D. M., J. Xu, et al. (1996). "Receptor specificity of the fibroblast growth factor family." J Biol Chem **271**(25): 15292-7.
- Otte, S. and C. Barlowe (2002). "The Erv41p-Erv46p complex: multiple export signals are required in trans for COPII-dependent transport from the ER." Embo J **21**(22): 6095-104.
- Oyajobi, B. O., A. Lomri, et al. (1999). "Isolation and characterization of human clonogenic osteoblast progenitors immunoselected from fetal bone marrow stroma using STRO-1 monoclonal antibody." J Bone Miner Res **14**(3): 351-61.
- Ozkurt, I. C., F. Q. Pirih, et al. (2004). "Parathyroid hormone induces E4bp4 messenger ribonucleic acid expression primarily through cyclic adenosine 3',5'-monophosphate signaling in osteoblasts." Endocrinology **145**(8): 3696-703.

- Ozkurt, I. C. and S. Tetradis (2003). "Parathyroid hormone-induced E4BP4/NFIL3 down-regulates transcription in osteoblasts." J Biol Chem **278**(29): 26803-9.
- Panda, D. K., D. Miao, et al. (2001). "Targeted ablation of the 25-hydroxyvitamin D 1alpha -hydroxylase enzyme: evidence for skeletal, reproductive, and immune dysfunction." Proc Natl Acad Sci U S A **98**(13): 7498-503.
- Pathi, S., J. B. Rutenberg, et al. (1999). "Interaction of Ihh and BMP/Noggin signaling during cartilage differentiation." Dev Biol **209**(2): 239-53.
- Perwad, F., N. Azam, et al. (2005). "Dietary and serum phosphorus regulate fibroblast growth factor 23 expression and 1,25-dihydroxyvitamin D metabolism in mice." Endocrinology **146**(12): 5358-64.
- Pfister, M. F., H. Hilfiker, et al. (1998). "Cellular mechanisms involved in the acute adaptation of OK cell Na/Pi-cotransport to high- or low-Pi medium." Pflugers Arch **435**(5): 713-9.
- Pfister, M. F., E. Lederer, et al. (1997). "Parathyroid hormone-dependent degradation of type II Na⁺/Pi cotransporters." J Biol Chem **272**(32): 20125-30.
- Plotkin, L. I., V. Lezcano, et al. (2008). "Connexin 43 is required for the anti-apoptotic effect of bisphosphonates on osteocytes and osteoblasts in vivo." J Bone Miner Res **23**(11): 1712-21.
- Plotkin, L. I., S. C. Manolagas, et al. (2007). "Glucocorticoids induce osteocyte apoptosis by blocking focal adhesion kinase-mediated survival. Evidence for inside-out signaling leading to anoikis." J Biol Chem **282**(33): 24120-30.
- Ponnambalam, S., C. Rabouille, et al. (1994). "The TGN38 glycoprotein contains two non-overlapping signals that mediate localization to the trans-Golgi network." J Cell Biol **125**(2): 253-68.
- Pratap, J., M. Galindo, et al. (2003). "Cell growth regulatory role of Runx2 during proliferative expansion of preosteoblasts." Cancer Res **63**(17): 5357-62.

- Prie, D., V. Huart, et al. (2002). "Nephrolithiasis and osteoporosis associated with hypophosphatemia caused by mutations in the type 2a sodium-phosphate cotransporter." N Engl J Med **347**(13): 983-91.
- Qiu, S., D. S. Rao, et al. (2003). "Reduced iliac cancellous osteocyte density in patients with osteoporotic vertebral fracture." J Bone Miner Res **18**(9): 1657-63.
- Rachez, C., Z. Suldan, et al. (1998). "A novel protein complex that interacts with the vitamin D3 receptor in a ligand-dependent manner and enhances VDR transactivation in a cell-free system." Genes Dev **12**(12): 1787-800.
- Radanovic, T., C. A. Wagner, et al. (2005). "Regulation of intestinal phosphate transport. I. Segmental expression and adaptation to low-P(i) diet of the type IIb Na(+)-P(i) cotransporter in mouse small intestine." Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol **288**(3): G496-500.
- Rattner, A., J. C. Hsieh, et al. (1997). "A family of secreted proteins contains homology to the cysteine-rich ligand-binding domain of frizzled receptors." Proc Natl Acad Sci U S A **94**(7): 2859-63.
- Razzaque, M. S., D. Sitara, et al. (2006). "Premature aging-like phenotype in fibroblast growth factor 23 null mice is a vitamin D-mediated process." Faseb J **20**(6): 720-2.
- Razzaque, M. S., R. St-Arnaud, et al. (2005). "FGF-23, vitamin D and calcification: the unholy triad." Nephrol Dial Transplant **20**(10): 2032-5.
- Razzouk, S., J. C. Brunn, et al. (2002). "Osteopontin posttranslational modifications, possibly phosphorylation, are required for in vitro bone resorption but not osteoclast adhesion." Bone **30**(1): 40-7.
- Rehli, M., A. Lichanska, et al. (1999). "TFEC is a macrophage-restricted member of the microphthalmia-TFE subfamily of basic helix-loop-helix leucine zipper transcription factors." J Immunol **162**(3): 1559-65.
- Rifas, L., S. Cheng, et al. (1997). "Skeletal casein kinase activity defect in the HYP mouse." Calcif Tissue Int **61**(3): 256-9.
- Riminucci, M., M. T. Collins, et al. (2003). "FGF-23 in fibrous dysplasia of bone and its relationship to renal phosphate wasting." J Clin Invest **112**(5): 683-92.

- Roberg, K. J., M. Crotwell, et al. (1999). "LST1 is a SEC24 homologue used for selective export of the plasma membrane ATPase from the endoplasmic reticulum." J Cell Biol **145**(4): 659-72.
- Robert, J., C. Auzan, et al. (2005). "Mechanisms of cell-surface rerouting of an endoplasmic reticulum-retained mutant of the vasopressin V1b/V3 receptor by a pharmacological chaperone." J Biol Chem **280**(51): 42198-206.
- Robert, J., E. Clauser, et al. (2005). "A novel C-terminal motif is necessary for the export of the vasopressin V1b/V3 receptor to the plasma membrane." J Biol Chem **280**(3): 2300-8.
- Roques, B. P., F. Noble, et al. (1993). "Neutral endopeptidase 24.11: structure, inhibition, and experimental and clinical pharmacology." Pharmacol Rev **45**(1): 87-146.
- Rosenthal, A. K., H. S. Cheung, et al. (1991). "Transforming growth factor beta 1 stimulates inorganic pyrophosphate elaboration by porcine cartilage." Arthritis Rheum **34**(7): 904-11.
- Rosenthal, A. K. and L. A. Henry (1996). "Retinoic acid stimulates pyrophosphate elaboration by cartilage and chondrocytes." Calcif Tissue Int **59**(2): 128-33.
- Rosenthal, A. K. and L. A. Henry (1999). "Thyroid hormones induce features of the hypertrophic phenotype and stimulate correlates of CPPD crystal formation in articular chondrocytes." J Rheumatol **26**(2): 395-401.
- Rowe, P. S., P. A. de Zoysa, et al. (2000). "MEPE, a new gene expressed in bone marrow and tumors causing osteomalacia." Genomics **67**(1): 54-68.
- Rowe, P. S., I. R. Garrett, et al. (2005). "Surface plasmon resonance (SPR) confirms that MEPE binds to PHEX via the MEPE-ASARM motif: a model for impaired mineralization in X-linked rickets (HYP)." Bone **36**(1): 33-46.
- Rowe, P. S., Y. Kumagai, et al. (2004). "MEPE has the properties of an osteoblastic phosphatonin and minihabin." Bone **34**(2): 303-19.

- Rowe, P. S., N. Matsumoto, et al. (2006). "Correction of the mineralization defect in hyp mice treated with protease inhibitors CA074 and pepstatin." Bone **39**(4): 773-86.
- Roy, M. E. and S. K. Nishimoto (2002). "Matrix Gla protein binding to hydroxyapatite is dependent on the ionic environment: calcium enhances binding affinity but phosphate and magnesium decrease affinity." Bone **31**(2): 296-302.
- Roy, S., J. Martel, et al. (1994). "Increased renal 25-hydroxyvitamin D3-24-hydroxylase messenger ribonucleic acid and immunoreactive protein in phosphate-deprived Hyp mice: a mechanism for accelerated 1,25-dihydroxyvitamin D3 catabolism in X-linked hypophosphatemic rickets." Endocrinology **134**(4): 1761-7.
- Roy, S. and H. S. Tenenhouse (1996). "Transcriptional regulation and renal localization of 1,25-dihydroxyvitamin D3-24-hydroxylase gene expression: effects of the Hyp mutation and 1,25-dihydroxyvitamin D3." Endocrinology **137**(7): 2938-46.
- Ruchon, A. F., M. Marcinkiewicz, et al. (2000). "Cellular localization of neprilysin in mouse bone tissue and putative role in hydrolysis of osteogenic peptides." J Bone Miner Res **15**(7): 1266-74.
- Ruchon, A. F., M. Marcinkiewicz, et al. (1998). "Pex mRNA is localized in developing mouse osteoblasts and odontoblasts." J Histochem Cytochem **46**(4): 459-68.
- Ruchon, A. F., H. S. Tenenhouse, et al. (2000). "Developmental expression and tissue distribution of Phex protein: effect of the Hyp mutation and relationship to bone markers." J Bone Miner Res **15**(8): 1440-50.
- Ruta, M., W. Burgess, et al. (1989). "Receptor for acidic fibroblast growth factor is related to the tyrosine kinase encoded by the fms-like gene (FLG)." Proc Natl Acad Sci U S A **86**(22): 8722-6.
- Rutsch, F., S. Vaingankar, et al. (2001). "PC-1 nucleoside triphosphate pyrophosphohydrolase deficiency in idiopathic infantile arterial calcification." Am J Pathol **158**(2): 543-54.
- Ryan, L. M., I. Kurup, et al. (1991). "Stimulation of cartilage inorganic pyrophosphate elaboration by ascorbate." Matrix **11**(4): 276-81.

- Sabbagh, Y., G. Boileau, et al. (2003). "Structure and function of disease-causing missense mutations in the PHEX gene." J Clin Endocrinol Metab **88**(5): 2213-22.
- Sabbagh, Y., G. Boileau, et al. (2001). "Disease-causing missense mutations in the PHEX gene interfere with membrane targeting of the recombinant protein." Hum Mol Genet **10**(15): 1539-46.
- Sabbagh, Y., T. O. Carpenter, et al. (2005). "Hypophosphatemia leads to rickets by impairing caspase-mediated apoptosis of hypertrophic chondrocytes." Proc Natl Acad Sci U S A **102**(27): 9637-42.
- Sabbagh, Y., A. O. Jones, et al. (2000). "PHEXdb, a locus-specific database for mutations causing X-linked hypophosphatemia." Hum Mutat **16**(1): 1-6.
- Saftig, P., E. Hunziker, et al. (1998). "Impaired osteoclastic bone resorption leads to osteopetrosis in cathepsin-K-deficient mice." Proc Natl Acad Sci U S A **95**(23): 13453-8.
- Sahni, M., D. C. Ambrosetti, et al. (1999). "FGF signaling inhibits chondrocyte proliferation and regulates bone development through the STAT-1 pathway." Genes Dev **13**(11): 1361-6.
- Saito, H., K. Kusano, et al. (2003). "Human fibroblast growth factor-23 mutants suppress Na⁺-dependent phosphate co-transport activity and 1 α ,25-dihydroxyvitamin D3 production." J Biol Chem **278**(4): 2206-11.
- Saito, H., A. Maeda, et al. (2005). "Circulating FGF-23 is regulated by 1 α ,25-dihydroxyvitamin D3 and phosphorus in vivo." J Biol Chem **280**(4): 2543-9.
- Saito, M., T. Iwawaki, et al. (2001). "Diphtheria toxin receptor-mediated conditional and targeted cell ablation in transgenic mice." Nat Biotechnol **19**(8): 746-50.
- Sambrook, J., E. F. Fritsch, et al. (1989). Molecular cloning : a laboratory manual. Cold Spring Harbor, N.Y., Cold Spring Harbor Laboratory.
- Sato, K. and A. Nakano (2002). "Emp47p and its close homolog Emp46p have a tyrosine-containing endoplasmic reticulum exit signal and function in glycoprotein secretion in *Saccharomyces cerevisiae*." Mol Biol Cell **13**(7): 2518-32.

- Sato, M., K. Sato, et al. (1996). "Endoplasmic reticulum localization of Sec12p is achieved by two mechanisms: Rer1p-dependent retrieval that requires the transmembrane domain and Rer1p-independent retention that involves the cytoplasmic domain." J Cell Biol **134**(2): 279-93.
- Scales, S. J., R. Pepperkok, et al. (1997). "Visualization of ER-to-Golgi transport in living cells reveals a sequential mode of action for COPII and COPI." Cell **90**(6): 1137-48.
- Scheiffele, P., J. Peranen, et al. (1995). "N-glycans as apical sorting signals in epithelial cells." Nature **378**(6552): 96-8.
- Schiavi, S. C. and O. W. Moe (2002). "Phosphatonins: a new class of phosphate-regulating proteins." Curr Opin Nephrol Hypertens **11**(4): 423-30.
- Schiller, P. C., P. P. Mehta, et al. (1992). "Hormonal regulation of intercellular communication: parathyroid hormone increases connexin 43 gene expression and gap-junctional communication in osteoblastic cells." Mol Endocrinol **6**(9): 1433-40.
- Schutze, M. P., P. A. Peterson, et al. (1994). "An N-terminal double-arginine motif maintains type II membrane proteins in the endoplasmic reticulum." Embo J **13**(7): 1696-705.
- Schwartz, I., D. Seger, et al. (1999). "Vitronectin." Int J Biochem Cell Biol **31**(5): 539-44.
- Segawa, H., E. Kawakami, et al. (2003). "Effect of hydrolysis-resistant FGF23-R179Q on dietary phosphate regulation of the renal type-II Na/Pi transporter." Pflugers Arch **446**(5): 585-92.
- Segawa, H., S. Yamanaka, et al. (2007). "Correlation between hyperphosphatemia and type II Na-Pi cotransporter activity in klotho mice." Am J Physiol Renal Physiol **292**(2): F769-79.
- Sekiya, I., K. Tsuji, et al. (2000). "SOX9 enhances aggrecan gene promoter/enhancer activity and is up-regulated by retinoic acid in a cartilage-derived cell line, TC6." J Biol Chem **275**(15): 10738-44.
- Serafini, T., G. Stenbeck, et al. (1991). "A coat subunit of Golgi-derived non-clathrin-coated vesicles with homology to the clathrin-coated vesicle coat protein beta-adaptin." Nature **349**(6306): 215-20.

- Serrano, M., A. W. Lin, et al. (1997). "Oncogenic ras provokes premature cell senescence associated with accumulation of p53 and p16INK4a." Cell **88**(5): 593-602.
- Sevier, C. S., O. A. Weisz, et al. (2000). "Efficient export of the vesicular stomatitis virus G protein from the endoplasmic reticulum requires a signal in the cytoplasmic tail that includes both tyrosine-based and di-acidic motifs." Mol Biol Cell **11**(1): 13-22.
- Shimada, T., H. Hasegawa, et al. (2004). "FGF-23 is a potent regulator of vitamin D metabolism and phosphate homeostasis." J Bone Miner Res **19**(3): 429-35.
- Shimada, T., M. Kakitani, et al. (2004). "Targeted ablation of Fgf23 demonstrates an essential physiological role of FGF23 in phosphate and vitamin D metabolism." J Clin Invest **113**(4): 561-8.
- Shimada, T., S. Mizutani, et al. (2001). "Cloning and characterization of FGF23 as a causative factor of tumor-induced osteomalacia." Proc Natl Acad Sci U S A **98**(11): 6500-5.
- Shimada, T., T. Muto, et al. (2002). "Mutant FGF-23 responsible for autosomal dominant hypophosphatemic rickets is resistant to proteolytic cleavage and causes hypophosphatemia in vivo." Endocrinology **143**(8): 3179-82.
- Shimada, T., I. Urakawa, et al. (2004). "FGF-23 transgenic mice demonstrate hypophosphatemic rickets with reduced expression of sodium phosphate cotransporter type IIa." Biochem Biophys Res Commun **314**(2): 409-14.
- Shirakabe, K., K. Terasawa, et al. (2001). "Regulation of the activity of the transcription factor Runx2 by two homeobox proteins, Msx2 and Dlx5." Genes Cells **6**(10): 851-6.
- Siggelkow, H., E. Schmidt, et al. (2004). "Evidence of downregulation of matrix extracellular phosphoglycoprotein during terminal differentiation in human osteoblasts." Bone **35**(2): 570-6.
- Simon, J. P., I. E. Ivanov, et al. (2000). "In vitro generation from the trans-Golgi network of coatomer-coated vesicles containing sialylated vesicular stomatitis virus-G protein." Methods **20**(4): 437-54.

- Sitara, D., S. Kim, et al. (2008). "Genetic evidence of serum phosphate-independent functions of FGF-23 on bone." PLoS Genet **4**(8): e1000154.
- Sitara, D., M. S. Razzaque, et al. (2004). "Homozygous ablation of fibroblast growth factor-23 results in hyperphosphatemia and impaired skeletogenesis, and reverses hypophosphatemia in Phex-deficient mice." Matrix Biol **23**(7): 421-32.
- Son, B. K., K. Kozaki, et al. (2006). "Statins protect human aortic smooth muscle cells from inorganic phosphate-induced calcification by restoring Gas6-Axl survival pathway." Circ Res **98**(8): 1024-31.
- Son, B. K., K. Kozaki, et al. (2007). "Gas6/Axl-PI3K/Akt pathway plays a central role in the effect of statins on inorganic phosphate-induced calcification of vascular smooth muscle cells." Eur J Pharmacol **556**(1-3): 1-8.
- Soung do, Y., Y. Dong, et al. (2007). "Runx3/AML2/Cbfa3 regulates early and late chondrocyte differentiation." J Bone Miner Res **22**(8): 1260-70.
- Soza, A., A. Norambuena, et al. (2004). "Sorting competition with membrane-permeable peptides in intact epithelial cells revealed discrimination of transmembrane proteins not only at the trans-Golgi network but also at pre-Golgi stages." J Biol Chem **279**(17): 17376-83.
- Spang, A., K. Matsuoka, et al. (1998). "Coatomer, Arf1p, and nucleotide are required to bud coat protein complex I-coated vesicles from large synthetic liposomes." Proc Natl Acad Sci U S A **95**(19): 11199-204.
- Stechschulte, D. J., Jr., D. C. Morris, et al. (1992). "Presence and specific concentration of carbonic anhydrase II in matrix vesicles." Bone Miner **17**(2): 187-91.
- Steitz, S. A., M. Y. Speer, et al. (2001). "Smooth muscle cell phenotypic transition associated with calcification: upregulation of Cbfa1 and downregulation of smooth muscle lineage markers." Circ Res **89**(12): 1147-54.
- Stenflo, J. (1999). "Contributions of Gla and EGF-like domains to the function of vitamin K-dependent coagulation factors." Crit Rev Eukaryot Gene Expr **9**(1): 59-88.

- Stockklausner, C., J. Ludwig, et al. (2001). "A sequence motif responsible for ER export and surface expression of Kir2.0 inward rectifier K(+) channels." FEBS Lett **493**(2-3): 129-33.
- Strom, T. M., F. Francis, et al. (1997). "Pex gene deletions in Gy and Hyp mice provide mouse models for X-linked hypophosphatemia." Hum Mol Genet **6**(2): 165-71.
- Suda, N., M. T. Gillespie, et al. (1996). "Expression of parathyroid hormone-related protein in cells of osteoblast lineage." J Cell Physiol **166**(1): 94-104.
- Suda, T., Y. Ueno, et al. (2003). "Vitamin D and bone." J Cell Biochem **88**(2): 259-66.
- Surmann-Schmitt, C., U. Dietz, et al. (2008). "Ucma, a novel secreted cartilage-specific protein with implications in osteogenesis." J Biol Chem **283**(11): 7082-93.
- Suzuki, A., C. Ghayor, et al. (2006). "Enhanced expression of the inorganic phosphate transporter Pit-1 is involved in BMP-2-induced matrix mineralization in osteoblast-like cells." J Bone Miner Res **21**(5): 674-83.
- Suzuki, A., G. Palmer, et al. (2000). "Stimulation of sodium-dependent phosphate transport and signaling mechanisms induced by basic fibroblast growth factor in MC3T3-E1 osteoblast-like cells." J Bone Miner Res **15**(1): 95-102.
- Suzuki, A., G. Palmer, et al. (2001). "Stimulation of sodium-dependent inorganic phosphate transport by activation of Gi/o-protein-coupled receptors by epinephrine in MC3T3-E1 osteoblast-like cells." Bone **28**(6): 589-94.
- Tadic, T., M. Dodig, et al. (2002). "Overexpression of Dlx5 in chicken calvarial cells accelerates osteoblastic differentiation." J Bone Miner Res **17**(6): 1008-14.
- Takahashi, S., T. Nakagawa, et al. (1995). "Localization of furin to the trans-Golgi network and recycling from the cell surface involves Ser and Tyr residues within the cytoplasmic domain." J Biol Chem **270**(47): 28397-401.

- Takayanagi, H., S. Kim, et al. (2002). "Induction and activation of the transcription factor NFATc1 (NFAT2) integrate RANKL signaling in terminal differentiation of osteoclasts." Dev Cell **3**(6): 889-901.
- Tang, B. L., J. Kausalya, et al. (1999). "A family of mammalian proteins homologous to yeast Sec24p." Biochem Biophys Res Commun **258**(3): 679-84.
- Tasheva, E. S., A. Koester, et al. (2002). "Mimecan/osteoglycin-deficient mice have collagen fibril abnormalities." Mol Vis **8**: 407-15.
- Tatsumi, S., K. Ishii, et al. (2007). "Targeted ablation of osteocytes induces osteoporosis with defective mechanotransduction." Cell Metab **5**(6): 464-75.
- Tatsumi, S., H. Segawa, et al. (1998). "Molecular cloning and hormonal regulation of PiT-1, a sodium-dependent phosphate cotransporter from rat parathyroid glands." Endocrinology **139**(4): 1692-9.
- Teitelbaum, S. L. and F. P. Ross (2003). "Genetic regulation of osteoclast development and function." Nat Rev Genet **4**(8): 638-49.
- Tenenhouse, H. S. (1984). "Investigation of the mechanism for abnormal renal 25-hydroxyvitamin D3-1-hydroxylase activity in the X-linked Hyp mouse." Endocrinology **115**(2): 634-9.
- Tenenhouse, H. S. (1999). "X-linked hypophosphataemia: a homologous disorder in humans and mice." Nephrol Dial Transplant **14**(2): 333-41.
- Tenenhouse, H. S. (2005). "Regulation of phosphorus homeostasis by the type ii a na/phosphate cotransporter." Annu Rev Nutr **25**: 197-214.
- Tenenhouse, H. S. and M. J. Econs (2001). Mendelian hypophosphatasias. New York, McGraw Hill Book Co.
- Tenenhouse, H. S. and G. Jones (1990). "Abnormal regulation of renal vitamin D catabolism by dietary phosphate in murine X-linked hypophosphatemic rickets." J Clin Invest **85**(5): 1450-5.
- Tenenhouse, H. S., J. Martel, et al. (1995). "Effect of P(i) restriction on renal Na(+)-P(i) cotransporter mRNA and immunoreactive protein in X-linked Hyp mice." Am J Physiol **268**(6 Pt 2): F1062-9.

- Tenenhouse, H. S., R. A. Meyer, Jr., et al. (1992). "Renal phosphate transport and vitamin D metabolism in X-linked hypophosphatemic Gy mice: responses to phosphate deprivation." Endocrinology **131**(1): 51-6.
- Tenenhouse, H. S., S. Roy, et al. (1998). "Differential expression, abundance, and regulation of Na⁺-phosphate cotransporter genes in murine kidney." Am J Physiol **275**(4 Pt 2): F527-34.
- Tenenhouse, H. S. and C. R. Sriver (1979). "Renal adaptation to phosphate deprivation in the Hyp mouse with X-linked hypophosphatemia." Can J Biochem **57**(6): 938-44.
- Tenenhouse, H. S. and C. R. Sriver (1979). "Renal brush border membrane adaptation to phosphorus deprivation in the Hyp/Y mouse." Nature **281**(5728): 225-7.
- Tenenhouse, H. S., A. Werner, et al. (1994). "Renal Na(+)-phosphate cotransport in murine X-linked hypophosphatemic rickets. Molecular characterization." J Clin Invest **93**(2): 671-6.
- Terkeltaub, R. A. (2001). "Inorganic pyrophosphate generation and disposition in pathophysiology." Am J Physiol Cell Physiol **281**(1): C1-C11.
- Thesingh, C. W. and J. P. Scherft (1985). "Fusion disability of embryonic osteoclast precursor cells and macrophages in the microphthalmic osteopetrotic mouse." Bone **6**(1): 43-52.
- Thomas, D. M., S. A. Johnson, et al. (2004). "Terminal osteoblast differentiation, mediated by runx2 and p27KIP1, is disrupted in osteosarcoma." J Cell Biol **167**(5): 925-34.
- Thompson, D. L., Y. Sabbagh, et al. (2002). "Ontogeny of Phex/PHEX protein expression in mouse embryo and subcellular localization in osteoblasts." J Bone Miner Res **17**(2): 311-20.
- Tieder, M., D. Modai, et al. (1985). "Hereditary hypophosphatemic rickets with hypercalciuria." N Engl J Med **312**(10): 611-7.
- Tomkinson, A., J. Reeve, et al. (1997). "The death of osteocytes via apoptosis accompanies estrogen withdrawal in human bone." J Clin Endocrinol Metab **82**(9): 3128-35.

- Tondravi, M. M., S. R. McKercher, et al. (1997). "Osteopetrosis in mice lacking haematopoietic transcription factor PU.1." Nature **386**(6620): 81-4.
- Toole, B. P., G. Jackson, et al. (1972). "Hyaluronate in morphogenesis: inhibition of chondrogenesis in vitro." Proc Natl Acad Sci U S A **69**(6): 1384-6.
- Toomes, C., J. James, et al. (1999). "Loss-of-function mutations in the cathepsin C gene result in periodontal disease and palmoplantar keratosis." Nat Genet **23**(4): 421-4.
- Toyosawa, S., S. Shintani, et al. (2001). "Dentin matrix protein 1 is predominantly expressed in chicken and rat osteocytes but not in osteoblasts." J Bone Miner Res **16**(11): 2017-26.
- Traebert, M., J. Roth, et al. (2000). "Internalization of proximal tubular type II Na-P(i) cotransporter by PTH: immunogold electron microscopy." Am J Physiol Renal Physiol **278**(1): F148-54.
- Traebert, M., H. Volkl, et al. (2000). "Luminal and contraluminal action of 1-34 and 3-34 PTH peptides on renal type IIa Na-P(i) cotransporter." Am J Physiol Renal Physiol **278**(5): F792-8.
- Tran-Paterson, R., G. Boileau, et al. (1990). "Comparative levels of CALLA/neutral endopeptidase on normal granulocytes, leukemic cells, and transfected COS-1 cells." Blood **76**(4): 775-82.
- Trivedi, D. P., R. Doll, et al. (2003). "Effect of four monthly oral vitamin D3 (cholecalciferol) supplementation on fractures and mortality in men and women living in the community: randomised double blind controlled trial." BMJ **326**(7387): 469.
- Tuan, R. S., G. Boland, et al. (2003). "Adult mesenchymal stem cells and cell-based tissue engineering." Arthritis Res Ther **5**(1): 32-45.
- Turner, A. J. (1997). Endothelin converting enzyme. Oxford, BIOS scientific publishers Ltd.
- Turner, A. J. and K. Tanzawa (1997). "Mammalian membrane metalloproteases: NEP, ECE, KELL, and PEX." Faseb J **11**(5): 355-64.

- Uckert, W., G. Willmsky, et al. (1998). "RNA levels of human retrovirus receptors Pit1 and Pit2 do not correlate with infectibility by three retroviral vector pseudotypes." Hum Gene Ther **9**(17): 2619-27.
- Uno, J. K., O. I. Kolek, et al. (2006). "The role of tumor necrosis factor alpha in down-regulation of osteoblast Phex gene expression in experimental murine colitis." Gastroenterology **131**(2): 497-509.
- Urakawa, I., Y. Yamazaki, et al. (2006). "Klotho converts canonical FGF receptor into a specific receptor for FGF23." Nature **444**(7120): 770-4.
- Vaingankar, S. M., T. A. Fitzpatrick, et al. (2004). "Subcellular targeting and function of osteoblast nucleotide pyrophosphatase phosphodiesterase 1." Am J Physiol Cell Physiol **286**(5): C1177-87.
- van Bezooijen, R. L., B. A. Roelen, et al. (2004). "Sclerostin is an osteocyte-expressed negative regulator of bone formation, but not a classical BMP antagonist." J Exp Med **199**(6): 805-14.
- van Vliet, C., E. C. Thomas, et al. (2003). "Intracellular sorting and transport of proteins." Prog Biophys Mol Biol **83**(1): 1-45.
- Vargas, M. A., M. St-Louis, et al. (2003). "Parathyroid hormone-related protein(1-34) regulates Phex expression in osteoblasts through the protein kinase A pathway." Endocrinology **144**(11): 4876-85.
- Vatsa, A., R. G. Breuls, et al. (2008). "Osteocyte morphology in fibula and calvaria --- is there a role for mechanosensing?" Bone **43**(3): 452-8.
- Verborgt, O., G. J. Gibson, et al. (2000). "Loss of osteocyte integrity in association with microdamage and bone remodeling after fatigue in vivo." J Bone Miner Res **15**(1): 60-7.
- Verri, T., D. Markovich, et al. (1995). "Cloning of a rabbit renal Na-Pi cotransporter, which is regulated by dietary phosphate." Am J Physiol **268**(4 Pt 2): F626-33.
- Veverka, V., A. J. Henry, et al. (2009). "Characterization of the structural features and interactions of sclerostin: molecular insight into a key regulator of Wnt-mediated bone formation." J Biol Chem **284**(16): 10890-900.

- Votsmeier, C. and D. Gallwitz (2001). "An acidic sequence of a putative yeast Golgi membrane protein binds COPII and facilitates ER export." Embo J **20**(23): 6742-50.
- Wada, T., M. D. McKee, et al. (1999). "Calcification of vascular smooth muscle cell cultures: inhibition by osteopontin." Circ Res **84**(2): 166-78.
- Wai, A. W., L. J. Ng, et al. (1998). "Disrupted expression of matrix genes in the growth plate of the mouse cartilage matrix deficiency (cmd) mutant." Dev Genet **22**(4): 349-58.
- Wang, D., K. Christensen, et al. (1999). "Isolation and characterization of MC3T3-E1 preosteoblast subclones with distinct in vitro and in vivo differentiation/mineralization potential." J Bone Miner Res **14**(6): 893-903.
- Wang, H., Y. Yoshiko, et al. (2008). "Overexpression of fibroblast growth factor 23 suppresses osteoblast differentiation and matrix mineralization in vitro." J Bone Miner Res **23**(6): 939-48.
- Wang, L., L. Du, et al. (1999). "Evidence for Phex haploinsufficiency in murine X-linked hypophosphatemia." Mamm Genome **10**(4): 385-9.
- Wang, S., M. Krinks, et al. (1997). "Frzb, a secreted protein expressed in the Spemann organizer, binds and inhibits Wnt-8." Cell **88**(6): 757-66.
- Wang, W. and T. Kirsch (2002). "Retinoic acid stimulates annexin-mediated growth plate chondrocyte mineralization." J Cell Biol **157**(6): 1061-9.
- Wang, X., J. Matteson, et al. (2004). "COPII-dependent export of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator from the ER uses a di-acidic exit code." J Cell Biol **167**(1): 65-74.
- Ward, L. M., F. Rauch, et al. (2004). "Resolution of severe, adolescent-onset hypophosphatemic rickets following resection of an FGF-23-producing tumour of the distal ulna." Bone **34**(5): 905-11.
- Ward, T. H., R. S. Polishchuk, et al. (2001). "Maintenance of Golgi structure and function depends on the integrity of ER export." J Cell Biol **155**(4): 557-70.

- Watanabe, H., K. Kimata, et al. (1994). "Mouse cartilage matrix deficiency (cmd) caused by a 7 bp deletion in the aggrecan gene." Nat Genet **7**(2): 154-7.
- Waters, M. G., T. Serafini, et al. (1991). "'Coatomer': a cytosolic protein complex containing subunits of non-clathrin-coated Golgi transport vesicles." Nature **349**(6306): 248-51.
- Weber, T. J., S. Liu, et al. (2003). "Serum FGF23 levels in normal and disordered phosphorus homeostasis." J Bone Miner Res **18**(7): 1227-34.
- Weinstein, M., X. Xu, et al. (1998). "FGFR-3 and FGFR-4 function cooperatively to direct alveogenesis in the murine lung." Development **125**(18): 3615-23.
- Weinstein, R. S., R. L. Jilka, et al. (1998). "Inhibition of osteoblastogenesis and promotion of apoptosis of osteoblasts and osteocytes by glucocorticoids. Potential mechanisms of their deleterious effects on bone." J Clin Invest **102**(2): 274-82.
- Weiss, M. J., D. E. Cole, et al. (1988). "A missense mutation in the human liver/bone/kidney alkaline phosphatase gene causing a lethal form of hypophosphatasia." Proc Natl Acad Sci U S A **85**(20): 7666-9.
- Werner, A., M. L. Moore, et al. (1991). "Cloning and expression of cDNA for a Na/Pi cotransport system of kidney cortex." Proc Natl Acad Sci U S A **88**(21): 9608-12.
- Wesson, J. A., R. J. Johnson, et al. (2003). "Osteopontin is a critical inhibitor of calcium oxalate crystal formation and retention in renal tubules." J Am Soc Nephrol **14**(1): 139-47.
- Westendorf, J. J., S. K. Zaidi, et al. (2002). "Runx2 (Cbfa1, AML-3) interacts with histone deacetylase 6 and represses the p21(CIP1/WAF1) promoter." Mol Cell Biol **22**(22): 7982-92.
- White, K. E., G. Carn, et al. (2001). "Autosomal-dominant hypophosphatemic rickets (ADHR) mutations stabilize FGF-23." Kidney Int **60**(6): 2079-86.
- White, K. E., K. B. Jonsson, et al. (2001). "The autosomal dominant hypophosphatemic rickets (ADHR) gene is a secreted polypeptide

- overexpressed by tumors that cause phosphate wasting." J Clin Endocrinol Metab **86**(2): 497-500.
- Whyte, M. P. (1994). "Hypophosphatasia and the role of alkaline phosphatase in skeletal mineralization." Endocr Rev **15**(4): 439-61.
- Whyte, M. P., S. E. Obrecht, et al. (2002). "Osteoprotegerin deficiency and juvenile Paget's disease." N Engl J Med **347**(3): 175-84.
- Winkler, D. G., M. K. Sutherland, et al. (2003). "Osteocyte control of bone formation via sclerostin, a novel BMP antagonist." EMBO J **22**(23): 6267-76.
- Wu, L. N., B. R. Genge, et al. (1991). "Collagen-binding proteins in collagenase-released matrix vesicles from cartilage. Interaction between matrix vesicle proteins and different types of collagen." J Biol Chem **266**(2): 1195-203.
- Wuthier, R. E. (1973). "The role of phospholipids in biological calcification: distribution of phospholipase activity in calcifying epiphyseal cartilage." Clin Orthop Relat Res(90): 191-200.
- Xiao, G., D. Jiang, et al. (2005). "Cooperative interactions between activating transcription factor 4 and Runx2/Cbfa1 stimulate osteoblast-specific osteocalcin gene expression." J Biol Chem **280**(35): 30689-96.
- Xiao, Z., C. E. Camalier, et al. (2007). "Analysis of the extracellular matrix vesicle proteome in mineralizing osteoblasts." J Cell Physiol **210**(2): 325-35.
- Xiao, Z. S., M. Crenshaw, et al. (1998). "Intrinsic mineralization defect in Hyp mouse osteoblasts." Am J Physiol **275**(4 Pt 1): E700-8.
- Xu, H., K. W. Lee, et al. (1998). "Novel recognition motif on fibroblast growth factor receptor mediates direct association and activation of SNT adapter proteins." J Biol Chem **273**(29): 17987-90.
- Xu, T., P. Bianco, et al. (1998). "Targeted disruption of the biglycan gene leads to an osteoporosis-like phenotype in mice." Nat Genet **20**(1): 78-82.
- Xue, Y., A. C. Karaplis, et al. (2005). "Genetic models show that parathyroid hormone and 1,25-dihydroxyvitamin D3 play distinct and synergistic roles in postnatal mineral ion homeostasis and skeletal development." Hum Mol Genet **14**(11): 1515-28.

- Yamashita, T., M. Konishi, et al. (2002). "Fibroblast growth factor (FGF)-23 inhibits renal phosphate reabsorption by activation of the mitogen-activated protein kinase pathway." J Biol Chem **277**(31): 28265-70.
- Yamashita, T., M. Yoshioka, et al. (2000). "Identification of a novel fibroblast growth factor, FGF-23, preferentially expressed in the ventrolateral thalamic nucleus of the brain." Biochem Biophys Res Commun **277**(2): 494-8.
- Yamazaki, Y., R. Okazaki, et al. (2002). "Increased circulatory level of biologically active full-length FGF-23 in patients with hypophosphatemic rickets/osteomalacia." J Clin Endocrinol Metab **87**(11): 4957-60.
- Yang, S., C. Smith, et al. (1993). "1 alpha, 25-Dihydroxyvitamin D3 and 19-nor-1 alpha, 25-dihydroxyvitamin D2 suppress immunoglobulin production and thymic lymphocyte proliferation in vivo." Biochim Biophys Acta **1158**(3): 279-86.
- Yang, S., C. Smith, et al. (1993). "Vitamin D deficiency suppresses cell-mediated immunity in vivo." Arch Biochem Biophys **303**(1): 98-106.
- Yang, X.-F., H. Fourier, et al. (1994). "Site-directed mutagenesis and transfection methods in the study of prohormone processing. ." Neuroprotocols **5**: 157-168.
- Yang, X., K. Matsuda, et al. (2004). "ATF4 is a substrate of RSK2 and an essential regulator of osteoblast biology; implication for Coffin-Lowry Syndrome." Cell **117**(3): 387-98.
- Ye, L., Y. Mishina, et al. (2005). "Dmp1-deficient mice display severe defects in cartilage formation responsible for a chondrodysplasia-like phenotype." J Biol Chem **280**(7): 6197-203.
- Yoshida, C. A., T. Furuichi, et al. (2002). "Core-binding factor beta interacts with Runx2 and is required for skeletal development." Nat Genet **32**(4): 633-8.
- Yoshida, C. A., H. Yamamoto, et al. (2004). "Runx2 and Runx3 are essential for chondrocyte maturation, and Runx2 regulates limb growth through induction of Indian hedgehog." Genes Dev **18**(8): 952-63.

- Yoshida, H., S. Hayashi, et al. (1990). "The murine mutation osteopetrosis is in the coding region of the macrophage colony stimulating factor gene." Nature **345**(6274): 442-4.
- Yoshida, T., T. Fujimori, et al. (2002). "Mediation of unusually high concentrations of 1,25-dihydroxyvitamin D in homozygous klotho mutant mice by increased expression of renal 1alpha-hydroxylase gene." Endocrinology **143**(2): 683-9.
- Yoshiko, Y., G. A. Candelieri, et al. (2007). "Osteoblast autonomous Pi regulation via Pit1 plays a role in bone mineralization." Mol Cell Biol **27**(12): 4465-74.
- Yoshiko, Y., H. Wang, et al. (2007). "Mineralized tissue cells are a principal source of FGF23." Bone **40**(6): 1565-73.
- Yoshizawa, T., F. Takizawa, et al. (2004). "Homeobox protein MSX2 acts as a molecular defense mechanism for preventing ossification in ligament fibroblasts." Mol Cell Biol **24**(8): 3460-72.
- Yu, K., J. Xu, et al. (2003). "Conditional inactivation of FGF receptor 2 reveals an essential role for FGF signaling in the regulation of osteoblast function and bone growth." Development **130**(13): 3063-74.
- Yu, X., O. A. Ibrahimi, et al. (2005). "Analysis of the biochemical mechanisms for the endocrine actions of fibroblast growth factor-23." Endocrinology **146**(11): 4647-56.
- Yu, X., Y. Sabbagh, et al. (2005). "Genetic dissection of phosphate- and vitamin D-mediated regulation of circulating Fgf23 concentrations." Bone **36**(6): 971-7.
- Yuan, B., M. Takaiwa, et al. (2008). "Aberrant Phex function in osteoblasts and osteocytes alone underlies murine X-linked hypophosphatemia." J Clin Invest **118**(2): 722-34.
- Zebboudj, A. F., M. Imura, et al. (2002). "Matrix GLA protein, a regulatory protein for bone morphogenetic protein-2." J Biol Chem **277**(6): 4388-94.
- Zebboudj, A. F., V. Shin, et al. (2003). "Matrix GLA protein and BMP-2 regulate osteoinduction in calcifying vascular cells." J Cell Biochem **90**(4): 756-65.

- Zella, J. B. and H. F. DeLuca (2003). "Vitamin D and autoimmune diabetes." J Cell Biochem **88**(2): 216-22.
- Zerangue, N., B. Schwappach, et al. (1999). "A new ER trafficking signal regulates the subunit stoichiometry of plasma membrane K(ATP) channels." Neuron **22**(3): 537-48.
- Zhang, G. X., M. Mizuno, et al. (2004). "Regulation of mRNA expression of matrix extracellular phosphoglycoprotein (MEPE)/ osteoblast/osteocyte factor 45 (OF45) by fibroblast growth factor 2 in cultures of rat bone marrow-derived osteoblastic cells." Endocrine **24**(1): 15-24.
- Zhang, Y. W., N. Yasui, et al. (2000). "A RUNX2/PEBP2alpha A/CBFA1 mutation displaying impaired transactivation and Smad interaction in cleidocranial dysplasia." Proc Natl Acad Sci U S A **97**(19): 10549-54.
- Zhang, Y. W., N. Yasui, et al. (2000). "PEBP2alphaA/CBFA1 mutations in Japanese cleidocranial dysplasia patients." Gene **244**(1-2): 21-8.
- Ziegler, R., C. Scheidt-Nave, et al. (1995). "Pathophysiology of osteoporosis: unresolved problems and new insights." J Nutr **125**(7 Suppl): 2033S-2037S.
- Zoidis, E., C. Ghirlanda-Keller, et al. (2004). "Regulation of phosphate (Pi) transport and NaPi-III transporter (Pit-1) mRNA in rat osteoblasts." J Endocrinol **181**(3): 531-40.
- Zoidis, E., M. Gosteli-Peter, et al. (2002). "IGF-I and GH stimulate Phex mRNA expression in lungs and bones and 1,25-dihydroxyvitamin D(3) production in hypophysectomized rats." Eur J Endocrinol **146**(1): 97-105.
- Zoidis, E., J. Zapf, et al. (2000). "Phex cDNA cloning from rat bone and studies on phex mRNA expression: tissue-specificity, age-dependency, and regulation by insulin-like growth factor (IGF) I in vivo." Mol Cell Endocrinol **168**(1-2): 41-51.
- Zou, L., X. Zou, et al. (2007). "Effect of hyaluronan on osteogenic differentiation of porcine bone marrow stromal cells in vitro." J Orthop Res.

Zuzarte, M., S. Rinne, et al. (2007). "A di-acidic sequence motif enhances the surface expression of the potassium channel TASK-3." Traffic **8**(8): 1093-100.

**Annexe I : Autres contributions de l'auteur à
d'autres articles qui ne sont pas inclus dans cette
thèse**

1- Martin Pellicelli, Maryam Taheri, Mathieu St-Louis, Véronique Bériault,
Luc Desgroseillers, Guy Boileau and Alain Moreau

PTHRP(1-34)-mediated repression of the phex gene in osteoblastic cells
involves the transcriptional repressor E4BP4

Soumis le 11 juillet 2009 à *Journal of Biological Chemistry*
MS ID#: JBC/2009/041632

Annexe II : Accord des coauteurs (article 1)

1. Identification de l'étudiant et du programme

Mathieu St-Louis

Ph.D Biochimie

2. Description de l'article

Miguel A, Vargas, Mathieu St-Louis, Luc DesGroseillers, Jean-Louis Charli et Guy Boileau. (2004) Parathyroid hormone-related protein(1-34) regulates Phex expression in osteoblasts through the protein kinase A pathway. *Endocrinology*.144(11):4876-85.

3. Déclaration de tous les coauteurs autres que les étudiants

À titre de co-auteur de l'article ci-dessus, je suis d'accord pour que Mathieu St-Louis inclus cet article dans sa thèse de doctorat qui a pour titre *Contrôle de l'expression de la protéine PHEX et rôle de PHEX et FGF23 dans la minéralisation par les cellules MC3T3*.

Annexe III : Accord des coauteurs (article 2)

1. Identification de l'étudiant et du programme

Mathieu St-Louis

Ph.D Biochimie

2. Description de l'article

Mathieu St-Louis, Véronique Bériault, et Guy Boileau. (2009) PHEX cytosolic tail is essential for its incorporation in bone matrix vesicles and as a role in bone mineralization in MC3T3 cells. Cet article est en preparation pour soumission dans *Human molecular genetics*.

3. Déclaration de tous les coauteurs autres que les étudiants

À titre de co-auteur de l'article ci-dessus, je suis d'accord pour que Mathieu St-Louis inclus cet article dans sa thèse de doctorat qui a pour titre *Contrôle de l'expression de la protéine PHEX et rôle de PHEX et FGF23 dans la minéralisation par les cellules MC3T3*.

Annexe IV : Accord des coauteurs (article 3)

1. Identification de l'étudiant et du programme

Mathieu St-Louis

Ph.D Biochimie

2. Description de l'article

Mathieu St-Louis, Véronique Bériault, et Guy Boileau. (2009) Overexpression of FGF23 impairs mineralization in MC3T3 cells via a senescence pathway. Cet article est en preparation pour soumission dans *Journal of bone and mineral research*.

3. Déclaration de tous les coauteurs autres que les étudiants

À titre de co-auteur de l'article ci-dessus, je suis d'accord pour que Mathieu St-Louis inclus cet article dans sa thèse de doctorat qui a pour titre *Contrôle de l'expression de la protéine PHEX et rôle de PHEX et FGF23 dans la minéralisation par les cellules MC3T3*.

